

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240069

研究課題名(和文)細胞・組織の診断と評価のための多次元顕微分子イメージングシステムの開発と応用

研究課題名(英文)Multimodal molecular imaging system and its application for investigation of in vivo cell/tissue

研究代表者

荒木 勉 (ARAKI, Tsutomu)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：50136214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,900,000円、(間接経費) 11,370,000円

研究成果の概要(和文)：複雑系の中から所定の生体分子の形態・高次構造および変化をイメージングする手法の開発と応用を目指す。ここでは第二高調波発生光顕微鏡(SHG顕微鏡)とカソードルミネッセンス(CL)顕微鏡について研究した。SHG顕微鏡では人の皮膚をin vivo測定し、光老化におけるSHG光強度の変化を追跡した。また本方法を培養細胞のコロニー状況観測に利用し、さらにコラーゲンゲルと細胞との機械的な相互干渉を可視化した。

CL顕微鏡では10 nmレベルの空間分解で観察できうるナノ蛍光体作製に成功した。また、ナノ蛍光体を細胞内に取り込ませ、細胞内においてもCLイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Aims of this research project are development and application of novel imaging method that can inform molecular morphology and function of biological specimens. In the present research, we have focused on the second harmonic generation (SHG) microscopy and cathode luminescence (CL) microscopy. A polarization resolved, high-speed SHG microscope was developed. In in vivo measurement with this microscope, age related dermis collagen image were observed. Also we demonstrated SHG imaging of tissue-engineered cartilage composed of rabbit chondrocytes and type I collagen gel. From this, we confirmed that it is suitable for evaluating the quality of tissue-engineered cartilage. In the CL microscopy, three kinds of rare-earth-doped nanophosphors were synthesized and injected into macrophages. The spatial distribution of nanophosphors was visualized by using a scanning electron microscope CL system.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：コラーゲン カソードルミネッセンス SHG顕微鏡 分子イメージング 細胞培養 in vivo生体計測  
ナノ蛍光粒子 MEMS

### 1. 研究開始当初の背景

医学・生物学をはじめとするライフサイエンス分野において複雑系の中から所定の生体分子を生きのまま、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高機能の「分子イメージング顕微鏡技術」が切望されている。

再生治療では細胞の活性を診断し安全性を管理する手法の開発が重要な課題となる。培養細胞の活性状況は細胞骨格の弾性率変化を介して細胞膜タンパク質の流動性や局在性に反映されることはよく知られている。

さらに力学刺激付与による細胞の分化誘導の研究が積極的に進められているが、ここでは細胞自体の診断と同時に、コラーゲンなどの培養基質と細胞との力学関係を定量化する技術が求められる。分子イメージングのために様々な蛍光標識が供されている。色素染色においては、細胞やたんぱく質の機能を蛍光顕微鏡であっても、空間分解能は  $0.2\mu\text{m}$  程度である。

以上の拝啓を踏まえて、研究を計画し、実施した。

### 2. 研究の目的

今回、無染色で前処理なしにコラーゲンを分子標識し、密度だけでなく方向性なども含めて可視化することを目標として、新しいリアルタイムコラーゲンイメージング顕微鏡を開発する。またこの顕微鏡によって、人の真皮を実際に計測し、老化についての考察を行う。また、コラーゲンを培地とした培養細胞について、その成長ならびに品質評価のための指標を算出し、これに基づく環境制御を行うシステムを開発する。

前述のように、通常の光学顕微鏡においては空間分解能が光の波動性によって数百ナノメートルに制限される。分子イメージングを目指すにはそれより一桁以上の高空間分解が必要になる。そのためには電子顕微鏡が使われるが、生きた細胞への適用が困難である。そこで電子顕微鏡と光学計測とを融合させたカソードルミネッセンス(CL)を用いた細胞の超解像イメージングシステムを開発する。

このような分子イメージング顕微鏡は、従来にない全く新しいものであり、理工学分野におけるポテンシャルが高まる。また本手法はライフサイエンス分野のみならず、高性能液晶開発、半導体の品質評価など他分野へも応用できるため波及効果がきわめて大きい。

### 3. 研究の方法

以上の目的実現のためにはウェット系・ドライ系両面の知識が必要である。我々はプローブとして「光」を用いた「分子イメージング技術」に長年取り組んできた。本研究ではこれまでの研究成果を基礎に、「多次元化フォトニクス分子イメージングシステム」の実用化をはかる。またそれらの応用に踏み込む。

コラーゲンを可視化するための手法は極短パルスレーザー照射による第二高調波発生光(SHG 光)である。また、CL は、電子線によって蛍光を発するナノ微粒子をプローブとする手法である。各研究の方法については、次項の研究成果とともに併記をする。

### 4. 研究成果

#### (1) 皮膚診断用 SHG 光学顕微鏡の開発と応用

コラーゲンの基本構造はトロポコラーゲン(コラーゲン分子)であり、これが規則的に順次集合して階層的に太くなっていく。トロポコラーゲンは光波長オーダーで反転対称性構造を持たず、大きな2次の非線形光学特性を有している。そのため、非位相整合型 SHG 発生過程を介してコラーゲンから SHG 光が効率的に発生する。したがって、SHG 顕微鏡をもちいれば無染色でコラーゲンを可視化できる。

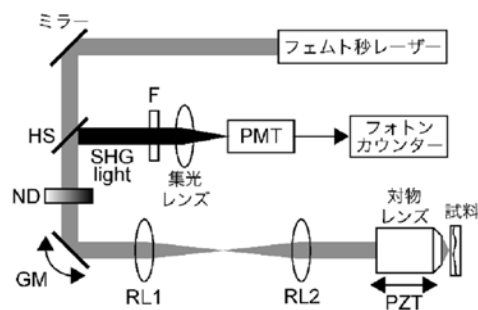


図1-1 皮膚計測用SHG顕微鏡

我々は真皮コラーゲン分布の *in vivo* 可視化のため、図1-1のような皮膚計測用 SHG 顕微鏡システムを試作した。ここでは SHG 光を得るために、皮膚への透過性のよいフェムト秒モード同期クロム・フォルステライトレーザー (Cr:F レーザー、中心波長 1250nm、パルス幅 100fs、繰り返し周波数 73MHz) を使用した。レーザービームは、ガルバノミラー(GM)とリレーレンズ光学系(LR1, 2)を経た後、対物レンズでサンプル照射することにより生体 SHG 光(中心波長 625nm)を発生させる。反射配置計測とするため、後方散乱成分を同じ対物レンズで集光し、ハーモニックセパレータ(HS、反射波長 625nm)と赤外カットフィルター(F)で生体 SHG 光を抽出した後、光電子増倍管(PM)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  $1.5\mu\text{m}$  と  $14\mu\text{m}$  である。皮膚に適用した場合、深さ  $300\mu\text{m}$  まで十分なコントラストでコラーゲンの分布像を得ることができた。

そこで加齢や日焼けによる真皮コラーゲン量の変化の程度を調査するため、頬の皮膚

を測定した。この場合、できるだけ広範囲なコラーゲン分布状態を観る目的で、 $600\mu\text{m}\times 600\mu\text{m}$ の測定領域を縦横にそれぞれ4画面つなぎ合わせて $2.4\text{mm}\times 2.4\text{mm}$ の拡大画面を作成した。ひとつの拡大画面を取得する時間は32秒である。図1-2に測定の様子を示す。



図1-2 皮膚コラーゲン計測システム

測定例として20代から50代にわたる女性皮膚の、表皮下 $100\mu\text{m}$ のSHG光画像を図1-3示すことができる。

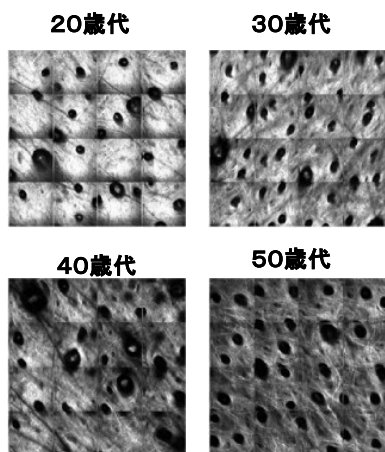


図1-3 女性各年代における頬のSHG画像

SHG信号強度は、コラーゲン濃度とコラーゲン線維の配向性に依存する。線維方向がそろっていれば信号発生効率がよくなる。コラーゲンの方向とレーザーの偏光方向が一致したときSHG信号発生効率が最大となることを利用すれば線維方向を知ることができる。

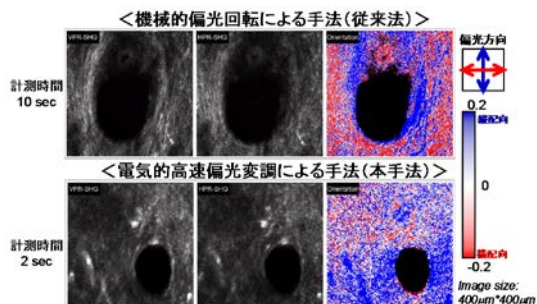


図1-4 機械的回転による手法と電氣的偏光光学素子による手法の画像比較

しかし従来の偏光素子を機械的に回転させる手法では測定に時間がかかり、体動による観測誤差が問題となる。そこで、そこで、電気光学ポッケルスセルを用いて非機械的な高速偏光スイッチングを行うと共に、イメージのデータ取得方法を改善することで、in vivo計測時に体動の影響を受けずにコラーゲン配向計測が可能な高速偏光分解SHG顕微鏡の開発を行った。図1-4に従来法と、本法の画像比較を行う。

最後に、さらに高次の非線形光学現象の利用ならびに臨床診断への応用の観点から、SHG顕微鏡と第三高調波発生光 (THG: third-harmonic-generation) 顕微鏡を利用した研究に着手した。ここでは切創に着目し、その治癒過程の時系列モニタリングを試みた。ラットの皮膚に切創を作り、皮膚損傷部から次第に新生コラーゲンが産出され、更に成熟していく様子が観察できた。

なお、本研究におけるヒト試験及び動物実験は、大阪大学大学院基礎工学研究科ヒト試験倫理委員会ならびに動物実験倫理委員会の承認を得て実施された。

## (2) SHG顕微鏡による培養細胞の評価

開発したSHG顕微鏡の応用として、再生医療で用いる培養組織の品質評価に対する有用性を検討した。日本白色家兔の関節軟骨から単離した初代軟骨細胞をI型アテロコラーゲンゲル内での最終密度が $2.0\times 10^6$  cells/mL (通常細胞密度ゲル)と $2.0\times 10^5$  cells/mL (低細胞密度ゲル)の2種類となるよう、2群に分けて軟骨細胞を播種した試料を2週間培養した。低播種密度で培養した軟骨細胞は脱分化し、軟骨組織の主成分であるII型コラーゲンの産生能を失うことが報告されている。観測時には細胞質を蛍光染色して可視化し、同視野のSHG画像と蛍光画像を3次元的に取得した。

図2-1に培養2週間で取得したSHG/蛍光画像の代表例を示す。通常細胞密度ゲルでは球状の細胞集団が多数分布しており、その場所がSHG画像の明確な縁を持つ球状の空洞として認識できた。一方、低細胞密度ゲルでは紡錘状に伸展した細胞が多く見られ、細胞の周囲のSHG光信号は特徴的な分布を示さなかった。正常な軟骨細胞は球形で、生体内では軟骨小腔内に集団を形成している。これに類似した細胞分布が見られる通常細胞密度ゲルは移植に適した高品質の組織と考えられるが、異常な細胞形態・分布を示す低細胞密度ゲルでは移植に十分な品質を確保できていない可能性が高い。

さらに軟骨細胞の基質産生を確認するために、軟骨細胞に特有で代表的な産生物であるII型コラーゲンを免疫染色した。低細胞密度ゲルに多く見られた脱分化した細胞ではII型コラーゲンの産生は見られなかったが、通常細胞密度ゲルで多く見られた球状の細胞集団は図2-2のようにII型コラーゲンを産生



していた。球状の細胞集団で見られた SHG 画像の空洞内は細胞と II 型コラーゲンで満たされており、特に空洞の縁周辺には殻のような形状で II 型コラーゲンが多く存在した。SHG 画像で培養の足場として用いた I 型コラーゲンのみが可視化されているのは、SHG の発生効率がコラーゲン型によって異なるためと考えられる。II 型コラーゲンは I 型コラーゲンに比べ細かい線維しか形成しないために発生する SHG 光は微弱であると予想される。本観測系では II 型コラーゲンからの SHG 光を検出する感度がなかったため、I 型コラーゲンを産生する軟骨細胞の集団が SHG 画像上では空洞として検出されたと考えられる。この空洞は高品質な通常細胞密度ゲルのみで確認できたので、未染色状態で培養組織を観察した場合でも SHG 画像のみで正常な細胞の分布を把握することが可能となり、非侵襲・無染色の品質評価法として SHG 観測が有効であると推察される

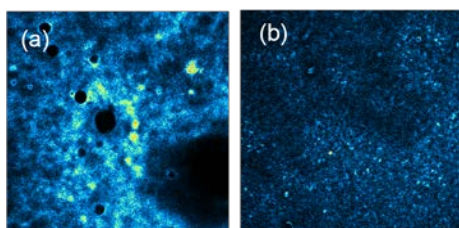


図 2-1 培養軟骨基質の SHG 画像。(a)通常細胞密度, (b)低細胞密度

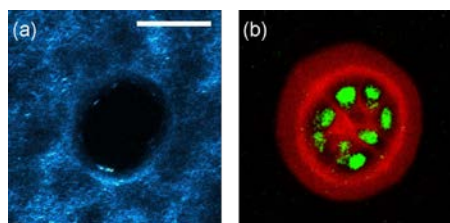


図 2-2 細胞集団近傍の SHG 画像(a)と免疫染色画像(b)。青：SHG，緑：細胞，赤：II 型コラーゲン。

### (3) カソードルミネッセンスによる高空間分解顕微鏡システムの開発

細胞内の生体分子を 1 分子レベル、即ち nm レベルの空間分解能で観察するため、電子線励起による発光 (CL:カソードルミネッセンス) を用いた顕微鏡技術の開発に取り組んだ。CL 顕微鏡を用いた生体分子観察では、電子線照射によって高効率に発光する蛍光プローブの作製が鍵となる。我々は、三色のナノサイズの蛍光体として  $Y_2O_3:Tm$ 、 $Y_2O_3:Tb$ 、 $Y_2O_3:Eu$  の作製に成功した。それぞれ、青、緑、赤色で発光する (図 3-1)。従って、3 種の分子をスペクトルにより見分ける事が可能になる。

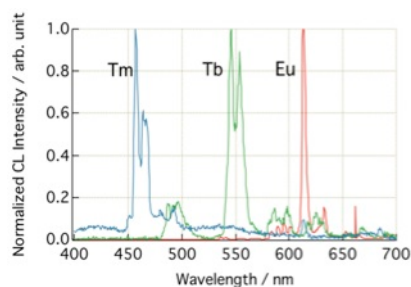


図 3-1  $Y_2O_3:Tm$ 、 $Y_2O_3:Tb$ 、 $Y_2O_3:Eu$  それぞれの CL スペクトル

本蛍光プローブは添加されている希土類元素が発光中心となるため、蛍光体のサイズを小さくすると希土類元素の数も減少し、発光強度が低下する。生体 1 分子イメージングを達成するためにはナノサイズの蛍光体が必要であるため、小さくても明るく光る蛍光体の作製に挑戦した。

$Y_2O_3:Eu$  に Zn を 5~30% のモル濃度で添加し、発光強度の比較を行なったところ、Zn の添加量が多い程高い CL 発光強度が得られた。30% 濃度で Zn を添加した場合、添加しない場合に比べ 6~7 倍程度の CL 発光強度が得られた。Zn を添加した  $Y_2O_3:Eu$  蛍光体 ( $Y_2O_3:Eu, Zn$ ) の CL 観察を行なったところ、粒径 30 nm の微小蛍光体の観察に成功した (図 3-2)。従って本蛍光体により個々の生体分子を染色できれば、30 nm 程度の空間分解能で生体分子を観察可能である事が示された。

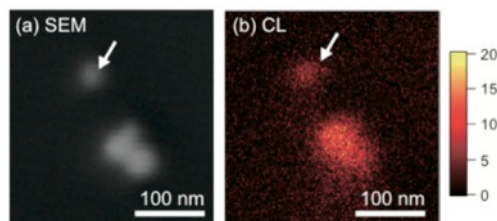


図 3-2 Zn を添加した  $Y_2O_3:Eu$  蛍光体の SEM 画像 (a) と CL 像 (b)

$Y_2O_3:Eu, Zn$  蛍光体を培養 HeLa 細胞に導入し、細胞内の蛍光体の CL 顕微鏡観察を行なった。図 3-3 (a) は HeLa 細胞の SEM 像であり、蛍光体が観察できる。凝集のためか粒径 200 nm 程度の蛍光体が観察された。図 3-3 (b) (c) より、細胞内の蛍光体を CL 顕微鏡にて SEM と同等の高空間分解能で観察できている。

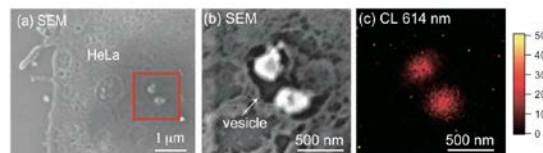


図 3-3 HeLa 細胞中の  $Y_2O_3:Eu, Zn$  蛍光体の SEM 画像 (a)、(a) の赤四角部分の拡大図 (b) 及び CL 像 (c)。

希土類添加  $Y_2O_3$  蛍光体は UV 励起により発光を示す。Zn を添加しても発光を発する (図 3-4 (a))。細胞が生きた状態で生体分子を蛍

光観察し、その後、CL顕微鏡により詳細な観察をするということが可能になる。実際に $Y_2O_3:Eu, Zn$  蛍光体を導入した HeLa 細胞の蛍光イメージングに成功した(図 3-4(b)-(d))。

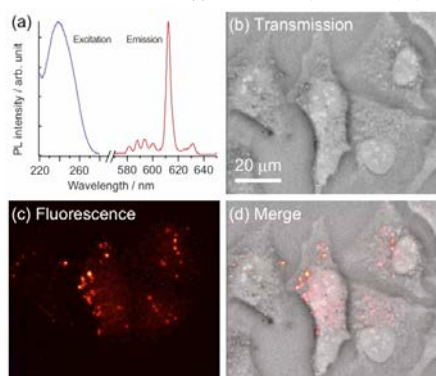


図 3-4  $Y_2O_3:Eu, Zn$  の励起蛍光スペクトル(a)と  $Y_2O_3:Eu, Zn$  を導入した培養 HeLa 細胞中の透過像(b)、蛍光像(c)、マージ像(d)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Jiro Miura, Kantaro Nishikawa, Mizuho Kubo, Shuichiro Fukushima, Mamoru Hashimoto, Fumio Takeshige, and Tsutomu Araki, “Accumulation of advanced glycation end-products in human dentin by aging”, *Arch Oral Biol*, Vol. 59, No. 2, pp. 119-124, 2014, (査読有). DOI:10.1016/j.archoralbio.2013.10.012
- ② Reiko Maehara, Shuichiro Fukushima, Masahiro Kino-oka, Tsutomu ARAKI, “Non-invasive detection of matrix-producing chondrocytes in tissue-engineered cartilage by second harmonic-generation microscopy”, *J Biomech Sci Eng*, Vol. 9, JBSE0007, 2014 (査読有) DOI: 10.1299/jbse.2014jbse0007
- ③ Yuji. Tanaka, Tsutomu Araki, et al., “Motion-artifact-robust, polarization-resolved second-harmonic-generation microscopy based on rapid polarization switching with electro-optic Pockells cell and its application to in vivo visualization of collagen fiber orientation in human facial skin”, *Biomed. Opt. Express*, Vol.5, 1099-1113, 2014 (査読有) DOI: 10.1364/BOE.5.001099
- ④ Taichi Furukawa, Hirohiko Niioka, Tsutomu Araki, Mamoru Hashimoto, et al., “High-resolution microscopy for biological specimens via cathodoluminescence and Eu- and Zn-doped  $Y_2O_3$  nanophosphors”, *Opt Express*, Vol. 21, pp. 25655-25663, 2013, (査読有)

DOI: 10.1364/OE.21.025655.

- ⑤ Takeshi, Yasui, Shuichiro Fukushima, Tsutomu Araki, et al., “In vivo observation of age-related structural changes of dermal collagen in human facial skin using collagen sensitive second harmonic generation microscope equipped with 1250-nm mode-locked Cr:Forsterite laser”, *J Biomed Opt*, Vol. 18, 31108, 2013 (査読有) DOI: 10.1117/1.JBO.18.3.031108
- ⑥ Ryouyuke Tnaka, Shuichiro Fukushima, Tsutomu Araki, et al., “In vivo visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy”, *J Biomed. Opt* Vol. 18, No. 6, 61231, 2013 (査読有) DOI: 10.1117/1.JBO.18.6.061231
- ⑦ Hirohiko Niioka, Tsutomu Araki, Mamoru Hashimoto, et al., “Multicolor cathode luminescence microscopy for biological imaging with nanophosphors”, *APEX*, Vol. 4, No. 11, 112402-112404, 2011 (査読有) DOI: 10.1143/APEX.4.112402

[学会発表] (計 36 件)

- ① 新岡宏彦, 荒木勉, 橋本守 他, “カソードルミネッセンス顕微鏡と光学顕微鏡の融合”, 顕微鏡学会分科会バイオメディカルニューマイクロスコープ (帝京大学医学部, 2014/3/6)
- ② Tsutomu Araki, “In situ visualization of tissue collagen by laser induced second harmonic generation light”, *Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging* (Taipei, Taiwan, 2014/2/25-26)
- ③ Takeshi Yasui, Shuichiro Fukushima, Tsutomu Araki, et al., “In vivo time-lapse imaging of skin burn wound healing using second-harmonic generation microscopy”, *BiOS 2014* (San Francisco, USA, 2014/2/2-3)
- ④ 田尾知世, 福島修一郎, 橋本守, 荒木勉, “非線形光学マルチモーダル顕微鏡によるアテローム性動脈硬化症病変の組織学的評価”, 第26回バイオエンジニアリング講演会 (仙台市, 2014/1/11-12)
- ⑤ Hirohiko Niioka, Tsutomu Araki, Mamoru Hashimoto, et al., “Rare-earth doped  $Y_2O_3$  nanophosphors for biological cathode-luminescence imaging”, *International Conference on Small Science* (Las Vegas, USA, 2013/12/15-18)
- ⑥ Yuji Tanaka, Shuichiro Fukushima, Tsutomu Araki, et al., “Fast polarization-resolved SHG microscopy for in vivo imaging of

collagen orientation”, CLEO/Pacific Rim 2013 (Kyoto, Japan, 2013/6/30-7/4)

- ⑦ Harsono Cahyadi, Mamoru Hashimoto, Tsutomu Araki, et al., “Detection of lipid uptake by triglyceride deposit cardiomyovascuopathy-indicated fibroblast using CARS microscopy”, JSAP-OSA Joint Symposia (松山市, 2012/9/11-14)
- ⑧ Tsutomu Araki, Non-staining, in situ visualization of collagen by femtosecond laser light and its application to tissue diagnosis”, The 2nd International Anatomical Sciences and Cell Biology Conference (Chiang Mai, Thailand, 2012/12/6-8)
- ⑨ 新岡宏彦, 荒木勉, 橋本守 他, “ナノ蛍光体粒子とカソードルミネッセンス顕微鏡を用いたマルチカラー生体イメージング”, 日本顕微鏡学会 (つくば市, 2012/5/14-16).
- ⑩ Tsutomu Araki, et al., “Skin diagnosis by non-invasive observation of dermal collagen with a second harmonic generation microscope”, MAF12, Strasbourg, France, 2011/9/11-14)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: カソードルミネッセンス用標識試薬

発明者: 新岡宏彦, 橋本守, 古川太一

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-121380

出願年月日: 平成 24 年 5 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<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: 40362644

### (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, Shuichiro)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号: 40362644

新岡 宏彦 (NIIOKA, Hirohiko)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号: 70552074