

令和 7 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H03924・23K25178

研究課題名（和文）第2、3の生体窓と高次非線形光学効果を駆使した深部超解像蛍光イメージング

研究課題名（英文）Deep super-resolution fluorescence imaging using the second and third biological windows and nonlinear optical effects

研究代表者

山中 真仁（Yamanaka, Masahito）

大阪大学・大学院工学研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：90648221

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）：本研究では、生体深部組織を単一細胞レベルで可視化することを目的に、近赤外光と非線形光学効果を活用した深部・高解像蛍光顕微鏡を開発した。生体深部での空間分解能や信号対ノイズ比を維持するため、波面補償による光学系の導入に加え、深層学習を用いた画像ノイズ低減手法も導入した。実験では、組織ファントムやマウス脳組織、さらに蛍光標識した細胞スフェロイドを用いて評価を行い、深部でも高い解像度とコントラストで三次元構造を観察可能であることを実証した。また、広視野観察と高解像観察を切り替え可能な統合システムも構築し、深部細胞観察の実用化に向けて大きな前進を遂げた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近赤外光と非線形な光学効果を活用した深部・高解像蛍光顕微鏡の開発を通じて、生体深部構造を単一細胞レベルで可視化する新たな観察技術を実現した点で、学術的に高い意義を有する。生体深部の高精細観察を可能にすることで、生体深部に関する基礎理解を加速させるとともに、生体深部観察が必要な研究領域への様々な応用展開も期待される。さらに、AI技術との融合による観察性能の向上は、バイオイメージングの高度化に貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a deep-tissue, high-resolution fluorescence microscope that utilizes near-infrared light and nonlinear optical effects, with the aim of visualizing deep biological tissues at the single-cell level. To maintain spatial resolution and signal-to-noise ratio in deep tissue imaging, we also introduced an adaptive optics using a deformable mirror and applied deep learning-based image denoising techniques. The system was evaluated using tissue phantoms, mouse brain tissues, and cell spheroids, demonstrating that high-resolution and high-contrast three-dimensional imaging is achievable even in deep regions. Additionally, we developed an integrated system that enables seamless switching between wide-field observation and high-resolution imaging, marking a significant step toward practical application in deep tissue cellular observation.

研究分野：応用光工学

キーワード：深部観察 蛍光 近赤外 生体窓

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内に移植された幹細胞の挙動や生着効率は、移植先の組織環境や疾患の種類、炎症の有無によって大きく左右されることが知られている [1]。しかしながら、これらの環境余韻が幹細胞の機能や分化にどのように影響を与えるのか、その分子機構の詳細については未解明な点が多い。再生医療にいける iPS 細胞や体性幹細胞、あるいはそれから分化誘導された細胞を生体内で一細胞レベルで可視化し、その細胞内分子動態を解析できる手法が確立されれば、幹細胞移植治療の安全性や有効性の向上に大きく貢献できるものと期待される。これまでに、2光子励起蛍光顕微鏡、光コヒーレンストモグラフィ、近赤外蛍光イメージング、さらにはマイクロ CT など、生体深部観察を目的とした多様なイメージング技術が開発されてきた。しかしながら、生体内の深部組織中の細胞を、生きた状態でかつ単一細胞レベルの高空間分解能で解析できる技術は、未だ確立に至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、生体内に移植された幹細胞の挙動や分子分布を単一細胞レベルで捉えることが可能な、深部・高解像度蛍光イメージング技術の実現を目指した。具体的には、生体深部まで十分な光が透過する近赤外光を活用し、生体深部観察においても蛍光信号を高感度に検出可能な光学系および顕微鏡システムを構築するとともに、蛍光プローブ分子の非線形な光学応用を利用した3次元的なイメージング技術の開発を通じ、試料深部の細胞を可視化する新規技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

光を用いて生体内部を観察する際に、観察可能な深度を制限する主な要因は、生体組織中で生じる光の散乱と水による光吸収である [2]。特に、可視光域の波長では、組織内部での光散乱が強く、生体深部までの光の到達が困難となり、観察可能深度を制限する大きな要因となっている。そのため、これまでの生体深部観察を目指した光学イメージング技術においては、可視光よりも波長が長く、生体内での光散乱が相対的に抑制される波長域が積極的に利用されている。具体的には、波長 650-950 nm や波長 1000-1350 nm 帯の波長域が利用されてきており、それらの波長域はそれぞれ第 1 および第 2 の生体窓と呼ばれている。さらに、近年では、これらよりも長波長の波長 1550-1850 nm 帯域においても、水による光吸収が局所的に低くなることに着目し、その波長帯の光を活用した深部観察技術が開発されている (波長 1550-1850 nm は第 3 の生体の窓と呼ばれる)。研究代表者はこれまで、第 3 の生体窓の波長帯の光に着目し、光コヒーレンストモグラフィ、光コヒーレンス顕微鏡、近赤外蛍光顕微鏡などといった深部イメージング技術の開発に取り組み、生体試料などの高散乱体の内部を観察する際の高い深達性および生体観察における有用性を実証してきた [3-6]。

本研究では、このような背景を踏まえ、第 2 および 3 の生体窓の近赤外光を蛍光プローブの励起、もしくは励起および検出に用いることで、生体深部観察における蛍光信号の高効率な検出を実現することを目指す。さらに、蛍光プローブの光励起時に生じる非線形な光学応答を活用することで、集光スポット中に局在する蛍光分子からの蛍光信号のみを検出し、周囲からの背景光を抑制しながら、高い空間分解能での 3 次元観察、および空間分解能のさらなる向上を目指した。また、生体深部観察では、生体透過性の高い光を用いたとしても、高い信号対ノイズ比を維持することは用意ではない。そこで、本研究では、空間分解能を維持しつつ信号対ノイズを向上する手段として、AI を用いたノイズリダクション技術も活用した。

4. 研究成果

本研究では、まず第 2 および 3 の生体窓の光を用いたレーザー走査型光学顕微鏡システムの開発に取り組んだ。開発した顕微鏡では、波長 900-1600 nm 波長域のレーザー光源を励起光として利用した。蛍光信号の検出には光電子増倍管 (浜松ホトニクス社製) を用いており、検出する蛍光信号の波長域に応じて、使用する光電子増倍管を可視域もしくは近赤外域で高感度に信号が検出できるものに、簡便に切り替えられる機構とした。波長 1600 nm 帯のレーザー光源としては、研究代表者が開発したフェムト秒超短パルスレーザーを用いた。このフェムト秒超短パルスレーザーは、単相カーボンナノチューブをモードロッカーとして用いた Er 添加ファイバーレーザー光源に、Er 添加ファイバー増幅器を組み合わせたものであり、シード光源およびファイバー増幅器の群速度分散の最適化と分散補償により、蛍光プローブの蛍光信号の誘起に十分なパルス幅かつ出力のパルス光が得られるものである。波長 900 nm などの他の近赤外波長域帯のレーザーとしては、半導体レーザー (CW レーザー) を利用した。

試料観察には、第 2 から第 3 の生体窓の波長域で高い透過率を有する高 NA 対物レンズ (Olympus, XLPLN25XSVMP2) を主に用いた。検出する蛍光の波長が 900 nm 以上などの長波長になる場合には、近赤外光用の光電子増倍管 (浜松ホトニクス, H10330C-75) を蛍光信号検出に利用した (可視域の蛍光信号検出の際には上述の通り別の光電子増倍管を利用)。試料のレーザー走

査には、2軸のガルバノミラー、または顕微鏡用の電動ステージを利用した。開発した顕微鏡システムでは、可視光波長域から、第2、第3の生体窓の波長域までで十分な透過率が確保できる光学部品を選定し、光学系を構築した。また、今回開発した光学顕微鏡システムは、蛍光プローブの励起時の非線形な光学応答を利用できる機構である。生体深部観察では、生体組織内での光散乱が抑制される近赤外波長の光を用いたとしても、波面収差により深部イメージング時の空間分解能が劣化する。そこで、本研究では、波面収差を抑制し、深部観察時においても高い空間分解能を維持するため、深部観察時の本レーザー走査型蛍光顕微鏡の光学系にデフォーダブルミラーを用いた補償光学系を導入した。

開発した顕微鏡システムにおける空間分解能などのイメージング性能を評価するため、近赤外波長で発光する量子ドットや希土類添加ナノ粒子を乾燥させたサンプルを組織ファントム越しに観察した。組織ファントムとしては、マウス脳組織に近い光散乱係数が得られる脂質水溶液を用いた。量子ドット上の組織ファントムの厚みを調整しながら、蛍光試料の蛍光画像を取得し、組織ファントムの各厚みにおける空間分解能を算出した。その結果、組織ファントムなしの観察結果と比較すると、多少空間分解能の低下はあったものの、組織ファントム越しの測定においても空間分解能の低下は15%程度と十分に抑制できていることが確認できた。また、本実験では、超短パルスレーザー、またはCWレーザーを光源として用いているが、両方の場合で、試料中に目立った損傷がないことも確認した。

次に、実際の生体組織試料を観察した。マウス脳を同様の近赤外光で発光する量子ドットで染色し、蛍光画像を取得した。本実験では、発光波長が異なる近赤外波長の量子ドットでマウス脳を染色し、深部観察時のイメージング画像を評価した。その結果、高いコントラストでマウス脳の染色部位を観察できることが確認できた。また、実際の生体試料観察においても、試料深部観察における空間分解能の低下が5%程度にとどまり、高い解像度が維持できていることも確認できた。また、今回、高い3次元空間分解能で試料を観察できることを実証するため、同様の近赤外発光蛍光プローブで標識した細胞のスフェロイドを準備し、3次元イメージングを行なった。今回用いた細胞スフェロイドは、培養下で形成された立体的な細胞集合体である。開発した蛍光顕微鏡で観察した結果、近赤外蛍光プローブで標識された部位が高いコントラストで3次元的に観察できることが確認でき、開発した光学顕微鏡装置を用いることで、単一細胞レベルの高い3次元空間分解能で試料を観察できるものであることが実証できた。

上述したレーザー走査型光学顕微鏡システムでは、高解像度で試料内部を観察できるという利点をもつ一方、一度に観察できる範囲は数100 μm 程度に限られる。そこで、本研究では、試料深部の観察をより効率的に行うため、まず広い範囲から目的となる観察部位をある程度特定し、その領域に対して高解像度観察を行うというアプローチをとった。その実現に向け、試料全体を簡便に広範囲で観察できる広視野近赤外蛍光イメージングシステムの開発も並行して進めた。この広視野イメージングシステムは、開発したレーザー走査型顕微鏡と統合しており、広視野での観察から高解像度での詳細な観察へとスムーズに切り替えることが可能である。

前述の通り、深部観察においては、試料の光吸収や水による光吸収などの影響で、蛍光信号も減衰し、高い信号対ノイズ比で試料を観察することは用意ではない。本研究では、さらに信号対ノイズ比を向上させるために、AI技術をもちいた画像ノイズ低減手法の利用を検討した。使用したモデルは、教師データを必要としないものであり、実際の生きた生体試料のような動きのある観察対象にも適用しやすいという利点がある。開発した蛍光顕微鏡で得られた深部観察像にこのモデルを適用した結果、ノイズ低減処理による空間分解能の低下を抑制しつつ、ノイズが大幅に低減され、蛍光プローブで標識した部位が明瞭に可視化されることが確認され、その有用性を実証することができた。

これらの結果から、生体深部の細胞の高解像度かつ高精細な観察へ向けた実用的な顕微鏡観察の実現に向けて大きく前進したと言える。

引用文献

1. N. Mossadegh-Keller, S. Sarrazin, P. K. Kandalla, L. Espinosa, E. Richard Stanley, S. L. Nutt, J. Moore, and M. H. Sieweke, *Nature* 497, 239-243 (2013).
2. L. A. Sordillo, Y. Pu, S. Prativiera, Y. Budansky, and R. R. Alfano, *Deep optical imaging of tissue using the second and third near-infrared spectral windows*, *J. Biomed. Opt.* 19, 056004 (2014).
3. M. Yamanaka, T. Teranishi, H. Kawagoe, and N. Nishizawa, *Optical coherence microscopy in 1700 nm spectral band for high-resolution label free deep-tissue imaging*, *Sci. Rep.* 6, 31715 (2016).
4. H. Kawagoe, M. Yamanaka, and N. Nishizawa, *Axial resolution and signal-to-noise ratio in deep-tissue imaging with 1.7 μm high-resolution optical coherence tomography with an ultrabroadband laser source*, *J. Biomed. Opt.* 22, 085002 (2017).
5. M. Yamanaka, N. Hayakawa, and N. Nishizawa, *High-spatial-resolution deep tissue imaging with spectral-domain optical coherence microscopy in the 1700-nm*

- spectral band, *J. Biomed. Opt.* 24, 070502 (2019).
6. M. Yamanaka, H. Niioka, T. Furukawa, and N. Niioka, Excitation of erbium-doped nanoparticles in 1550-nm wavelength region for deep tissue imaging with reduced degradation of spatial resolution, *J. Biomed. Opt.* 24, 070501 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 M. Yamanaka, H. Yukawa, D. Sonoyama, M. Tokunaga, O. Akiyama, H. Niioka, Y. Baba, N. Nishizawa |
| 2. 発表標題 Two-photon excited fluorescence microscopy with a simple, robust fiber laser source in the third near-infrared (NIR-3) spectral band |
| 3. 学会等名 Focus on Microscopy (国際学会) |
| 4. 発表年 2023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 | 湯川 博 (Hiroshi Yukawa) (30634646) | 名古屋大学・未来社会創造機構・特任教授 (13901) | |
| 研究分担者 | 新岡 宏彦 (Hirohiko Niioka) (70552074) | 九州大学・データ駆動イノベーション推進本部・教授 (17102) | |

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 |
|---------|---------|