

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04738

研究課題名（和文）第2近赤外窓領域を用いた生体深部1細胞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 single cell imaging technique through NIR-II window and its application to regenerative medicine

研究代表者

新岡 宏彦 (Niioka, Hirohiko)

大阪大学・データビリティフロンティア機構・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） 11,800,000円

研究成果の概要（和文）：再生医療技術への応用を目指し、マウスなどの生体内部の細胞を生きのままイメージングする技術の確立を行った。生体に対して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と、それらを観察するためのレーザー走査型顕微鏡装置の作製を行った。蛍光プローブとして980 nm励起1030 nm蛍光を示すY203:Ybナノ粒子の合成と、820 nm励起で1050 から1100 nm付近の蛍光を示すY203:Ndナノ粒子の合成を行った。これらのナノ粒子と生体模倣材料を用いて深部1.5 mmのイメージングに成功した。また、細胞イメージングが可能であることを実証した。

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、生体深部顕微鏡イメージング技術の開拓研究を行った。生体深部の細胞を生きのままイメージングする技術が確立されることで、生体内に移植したiPS細胞などの再生医療用の細胞を詳細に解析できるようになる。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る。

研究成果の概要（英文）：I established a technique for imaging living cells inside the body, such as mice, for application to regenerative medicine. I have synthesized fluorescent nano-particle probes that can be observed with the second near infrared window of light (wavelengths from 950 nm to 1600 nm) and fabricated a laser-operated microscopy system to observe them. The synthesis of Y203:Yb nanoparticles showing 1030 nm fluorescence at 980 nm excitation and Y203:Nd nanoparticles showing fluorescence around 1050 to 1100 nm at 820 nm excitation were performed as fluorescent probes. These nanoparticles were observed through 2% intralipid solution and successfully imaged at a depth of 1.5 mm. It was also demonstrated that cellular imaging is possible.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：第二近赤外窓領域 光学顕微鏡 生体深部イメージング 細胞イメージング 希土類蛍光体 蛍光プローブ

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おり、今後世界的な市場が期待されている。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、生体内部を直接モニタリングする技術が必要である。

マウス等小動物を用いた評価手法において、CT や MRI を用いた生体内部観察手法が知られているが、数百 μm ~ 1 mm 程度の空間分解能が限界であった。そのため、1 細胞レベルの空間分解能でマウス体内へ移植した細胞(組織)の観察はできず、さらに二種以上の細胞・分子種を見分け、詳細な解析をする事は不可能であった。また、光を用いたイメージングでは空間分解能は高いが、光が生体深部に到達できないため生体深部イメージングは困難であった。

2. 研究の目的

生体深部の移植細胞・組織を観察可能な近赤外イメージング法を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

生体透過性の良い近赤外光、特に第 2 の生体窓と呼ばれる波長 900~1600 nm の領域(第二近赤外窓領域)を用いることにより、生体深部細胞イメージングを行う。第二近赤外窓領域の光は、これまで生体深部イメージングに用いられていた第一近赤外領域の光(波長 650~900 nm)よりも、生体試料による光散乱の影響が低く、生体に対する透過性が高い。また、この波長の光を生体へ照射しても自家蛍光が殆ど発生せず、無視できる程小さいという利点がある [1,2]。

イメージングのためには蛍光プローブを用いる。第二近赤外窓領域の光で励起が可能、あるいはその領域の蛍光を発するプローブとして希土類イオンが導入された無機ナノ粒子を合成する。母材の無機材料として Y_2O_3 および NaYF_4 を用いる。さらに、第二近赤外窓領域の光を使ってイメージングが可能な顕微鏡システムを構築する。

4. 研究成果

(1) 1550 nm 励起と 980 nm 励起による深部イメージング時の空間分解能比較 [3]

$\text{NaYF}_4:\text{Er}, \text{Yb}$ は波長 1550 nm あるいは波長 980 nm の光で励起することで、波長 650 nm のアップコンバージョン蛍光を呈する。本蛍光ナノ粒子と、生体模倣材料である 2%イントラリピッド溶液(2%IL 溶液)[4]を用いて深部イメージングを行った。イメージングには、本研究のために作製した自作のレーザー走査型顕微鏡を用いた。顕微鏡は、第二近赤外窓領域の光に対して透過性の高い対物レンズや、感度の高い光電子増倍管を用いて構成した。

図 1(a)のように厚さ 500 μm の水あるいは 2%IL 溶液を対物レンズと資料の間に挟み、イメージングを行った。励起光として波長 1550 nm と 980 nm のレーザーを用いた。どちらの波長を用いた場合でもほぼ同じ空間分解能になるようにレーザービーム径を調節した。イメージング結果を図 1(b)-(e)に示す。水を使用した場合と 2%IL 溶液を使用した場合を比較すると、波長 1550 nm を用いた場合の方が空間分解能の劣化が抑えられている。空間分解能の劣化率は、1550 nm 励起では約 4%、980 nm 励起では約 40%であった。

さらに、 $\text{NaYF}_4:\text{Er}, \text{Yb}$ を培養 HeLa 細胞へ導入し、波長 1550 nm 励起による細胞イメージングを行った(図 2)。1550 nm の光は 980 nm の光に比べて水への吸収が大きく熱ダメージが危惧されたが、細胞を生きたまま観察することに成功した。

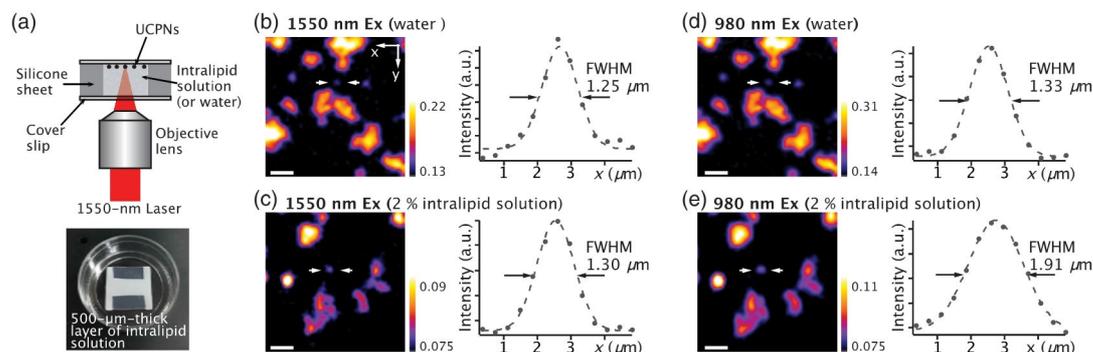


図 1 (a) 試料観察の模式図と 500 μm 厚 2%イントラリピッド溶液の写真。(b) 1550 nm、(d) 980 nm 励起で 500 μm 厚の水の層を通して観察した $\text{NaYF}_4:\text{Er}, \text{Yb}$ と、(c) 1550、(e) 980 nm 励起で 500 μm 厚の 2%イントラリピッド溶液の層を通して観察した $\text{NaYF}_4:\text{Er}, \text{Yb}$ の蛍光像。

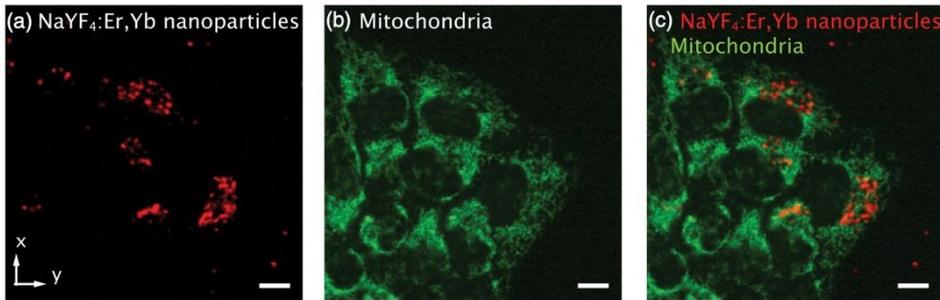


図 2 (a) $\text{NaYF}_4:\text{Er, Yb}$ ナノ粒子の蛍光像、(b) MitoTracker Orange で標識したミトコンドリアの蛍光画像、(c) (a)と(b)の合成画像 (赤: ナノ粒子、緑: ミトコンドリア)。

(2) $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ ナノ粒子の 980 nm 励起 1030 nm 蛍光を用いた深部イメージング [5]

$\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ ナノ粒子を第二近赤外窓領域イメージングに利用した。 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ は 980nm で励起されると、第二近赤外窓領域の波長 1030nm の蛍光を呈する [6]。Yb イオンの濃度に依存して蛍光強度が変化するため、Yb イオンの濃度がそれぞれ 0.5、1、2、5、10%の試料をゾルゲル法[7]で合成して蛍光強度を測定したところ、Yb イオン濃度 2%の $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ が最も明るく蛍光を発した。 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ (2%)ナノ粒子(粒径 100 - 280 nm)を均一沈殿法[7]で合成し、(1)の時と同様に 2%IL を用いてレーザー走査型顕微鏡観察を行ったところ、1.7 mm 深部の観察に成功した。さらに、 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ (2%)ナノ粒子を培養 HeLa 細胞に導入し、細胞を生きたまま観察できることを実証した。

(3) $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ と $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Nd}$ ナノ粒子を用いた二色イメージング

$\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Nd}$ は波長 820 nm の励起で 1050 - 1100 nm 付近の蛍光を呈する [8]。Nd イオンの濃度を変えながら明るく発光する Nd イオン濃度を探索し、Nd イオンの濃度を決定した。レーザー顕微鏡に 820 nm のレーザーを取り付け、二色イメージング可能な光学系を作製した。 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Nd}$ のナノ粒子を均一沈殿法で合成し、2%IL を通して観察した実験では、1.5 mm 深部のイメージングに成功した。また、より生体に近い試料として 2%IL の代わりに 1 mm 厚のブタの甲状腺越しのイメージングを行ったところ、 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Nd}$ と $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ のナノ粒子の観察が可能であった。さらに、 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Nd}$ と $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}$ のナノ粒子を用いて培養 HeLa を個別に染色し観察したところ、二色イメージングに成功した。生体内部において、二種類以上の細胞のトラッキングに使用できる技術になると考える。

(4) NaYF_4 を母材とした希土類添加ナノ粒子の合成とイメージング

希土類添加蛍光ナノ粒子の母材として Y_2O_3 よりも NaYF_4 を用いた方がフォノン緩和によるエネルギーロスが少なく、蛍光強度が上昇する。 NaYF_4 を母材とし、希土類を添加したバイオイメージング用途の蛍光ナノ粒子は販売されているものもあるが、 $\text{NaYF}_4:\text{Tm, Yb}$ や $\text{NaYF}_4:\text{Er, Yb}$ のように二種類の希土類を共添加したものしかない。従って、 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$ や $\text{NaYF}_4:\text{Nd}$ の合成を行った。合成した $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$ ナノ粒子の TEM 像を図 3 に示す。粒径は 50 nm 程度であった。さらに合成した $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$ および $\text{NaYF}_4:\text{Nd}$ を用いた細胞イメージングに成功した。

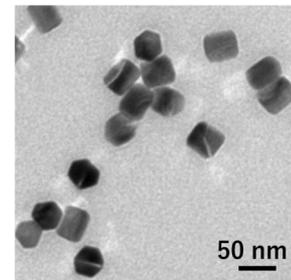


図 3 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$ ナノ粒子の TEM 像

< 引用文献 >

- [1] A. M. Smith et al., Nature Nanotechnology, 4, 710 (2009)
- [2] G. Hong et al., Nature Photonics, 8, 723 (2014)
- [3] M. Yamanaka et al., Journal of Biomedical Optics, 070501 (2019)
- [4] T. L. Troy and S. N. Thennadil, Journal of Biomedical Optics, 6, 167 (2001)
- [5] 投稿中
- [6] K. Takaichi et al., Applied Physics Letters, 84, 317 (2004)
- [7] S. Fukushima et al., Optical Materials Express, 6, 831 (2016)
- [8] C. A. Kodaira et al., Journal of Luminescence, 131, 727 (2011)

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 1件）

1. 著者名 Masahito Yamanaka, Hirohiko Niioka, Taichi Furukawa, Norihiko Nishizawa	4. 巻 24
2. 論文標題 Excitation of erbium-doped nanoparticles in 1550-nm wavelength region for deep tissue imaging with reduced degradation of spatial resolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.JBO.24.7.070501	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11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 秋野 善紀、山中 真仁、新岡 宏彦、古川 太一、西澤 典彦
2. 発表標題 Yb3+とNd3+の第2生体発光を用いたデュアルカラーイメージング
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋野 善紀、山中 真仁、新岡 宏彦、古川 太一、西澤 典彦
2. 発表標題 イッテルビウム発光を利用した近赤外発光イメージング
3. 学会等名 レーザー顕微鏡研究会第44回講演会・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Akino, Masahito Yamanaka, Hirohiko Niioka, Taichi Furukawa, Norihiko Nishizawa
2. 発表標題 Fluorescence imaging with Y2O3:Yb nanoparticles in the second near-infrared window
3. 学会等名 The 8th Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS ' 19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahito Yamanaka, Yoshiki Akino, Hirohiko Niioka, Taichi Furukawa, Norihiko Nishizawa
2. 発表標題 Near-infrared fluorescence imaging by using high nonlinear fluorescence responses of Er ³⁺ -doped nanoparticles under the excitation at 1520-1600 nm wavelength region
3. 学会等名 SPIE Photonics WEST BiOS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Akino, Masahito Yamanaka, Hirohiko Niioka, Taichi Furukawa, Norihiko Nishizawa
2. 発表標題 Near-infrared fluorescence imaging at 1030 nm wavelength region with Yb doped nanoparticles
3. 学会等名 SPIE Photonics WEST BiOS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirohiko Niioka
2. 発表標題 Development of nanophosphors for dual-modal cellular imaging with cathodoluminescence microscope and near-infrared light microscope
3. 学会等名 公益社団法人日本顕微鏡学会第61回シンポジウム -新時代へと深化する顕微鏡学 Microscopy Advancing to New Frontier- (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋野 善紀、山中 真仁、新岡 宏彦、古川 太一、西澤 典彦
2. 発表標題 Y ² O ₃ :Yb粒子を用いた近赤外域蛍光発光イメージング
3. 学会等名 第79回 応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤大暉、山中真仁、古川太一、新岡宏彦、西澤典彦
2. 発表標題 高次非線形なアップコンバージョン蛍光発光を用いた蛍光イメージング
3. 学会等名 レーザー学会第511回研究会「ファイバレーザー技術」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山中真仁、佐藤大暉、古川太一、新岡宏彦、三宅淳、西澤典彦
2. 発表標題 Er 添加ナノ粒子の高次非線形応答を用いた蛍光イメージング
3. 学会等名 第78回 応用物理学会秋季学術講演会 講演奨励賞受賞講演
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤大暉、山中真仁、古川太一、新岡宏彦、西澤典彦
2. 発表標題 励起光強度変調によるY203:Tm,Yb ナノ粒子の高次非線形なアップコンバージョン蛍光発光
3. 学会等名 第78回 応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daiki Sato, Masahito Yamanaka, Taichi Furukawa, Hirohiko Niioka, Jun Miyake, and Norihiko Nishizawa
2. 発表標題 Fluorescence imaging using upconversion fluorescence emission in 480-nm wavelength region from Y203:Tm,Yb nanoparticle
3. 学会等名 The 6th Advanced Lasers and Photon Sources (ALPS ' 17) (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----