

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：14701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K03561

研究課題名(和文) 光熱変換顕微計測法による生細胞の統合的熱物性解析

研究課題名(英文) Integrated thermophysical property analysis of live cells by photothermal microscopy

研究代表者

宮崎 淳 (Jun, Miyazaki)

和歌山大学・システム工学部・講師

研究者番号：50467502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞内という微小な空間を対象に、光熱変換顕微鏡を基盤とする熱伝導計測法を確立し、細胞の熱と機能との関係、及び細胞内の温度不均一の原因について理解を目指した。具体的な研究項目として、光熱変換顕微鏡により細胞内のミトコンドリアを高感度・高品質にイメージングするための新たな光検出器、および測定光学系に関する技術開発を行った。さらに、新たに提案した同時多周波数計測法の有効性とその問題点を明らかにした。またミトコンドリアの選択的計測に向けた培養条件の検討、および2波長光熱イメージングによる細胞器の分割・識別を行い、ミトコンドリア近傍の熱伝導率計測に関する実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞などの病態細胞では亢進した熱発生があること、細胞活性に依存して熱伝導率が変化することが報告されており、本研究で開発した熱物性計測法は新規診断、治療法の開発に貢献すると期待できる。さらにナノテクノロジーを基盤とするマイクロマシン、ナノマシンの高効率・高速動作にはまさつの制御と熱散逸過程の把握がキーポイントとなり、本研究で提案したマイクロな熱物性測定法はその実現に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop an optical method for measuring heat conduction inside a cell based on photothermal microscopy. Using this system, we aimed to reveal the relationship between heat and cellular function and the cause of the temperature imbalance observed inside a cell.

This project developed a novel photodetector and optical setup that enable high-sensitivity and high-fidelity photothermal imaging of mitochondria in live cells. We demonstrated the effectiveness of the simultaneous multi-frequency method for measuring the thermal conductivity of moving objects.

We identified cellular organelles observed by photothermal microscope and examined optimal culture conditions for selective imaging of mitochondria. Subsequently, thermal conductivity measurements in the vicinity of mitochondria were performed.

研究分野：光計測

キーワード：光熱変換顕微鏡 生細胞イメージング 熱伝導 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

熱は細胞にとって最も重要な物理量の一つであり、細胞が示す多様な機能と密接な関係がある。近年、細胞内というこれまで測定の対象とならなかった微小な空間での温度分布が温度感受性の蛍光分子により測定できるようになり、古典的な熱力学からは説明のつかない細胞内の温度分布の存在が複数のグループによって見出された。これらの研究は、その物理的機構の解明の必要性とともに、細胞スケールの生命システムにおいて温度・熱とは何かをという問題を改めて提起した。細胞の熱と機能との関係、及び細胞内の温度不均一の原因について理解するには、温度に加えて熱の伝わりやすさである熱伝導率の測定が重要である。本研究では細胞スケールでの統合的熱物性解析に向けた、光熱変換顕微鏡法による細胞内器官の熱伝導計測法に関する研究を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では申請者が独自に開発を行ってきた光熱変換顕微鏡法を基盤とした高感度な熱伝導計測法を開発し、細胞スケールでの統合的熱物性解析を行う。具体的には動物細胞を対象に、光熱変換顕微鏡法により測定されるミトコンドリア近傍の熱伝導率と、蛍光イメージングから得られる温度分布との相関を調べる。また温度と熱伝導率から、細胞内での熱の流れを解析し、実際に細胞内で温度のむらがあるのか明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、最初に本計画の鍵となる高感度な熱伝導率計測システムを開発する。具体的には(1)光熱変換顕微鏡の画質と信号雑音比向上に向けた新規光学系および低雑音光検出器の作製、(2)同時多周波数同期検波法による高精度熱伝導計測法の開発を行う。それにより(3)生細胞を対象とした光熱変換イメージングと熱伝導率計測を行い、熱伝導率と温度の相関・熱エネルギーの流れを解析することで細胞レベルの不均一な温度分布の起源を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 光熱変換顕微鏡の画質と信号雑音比向上のための新規光検出器および光学系の構築

光熱変換顕微鏡において、生細胞を観察する際に問題となっていた画質低下を解決するため、高ダイナミックレンジかつ低雑音な光検出器を新たに作製した。さらに測定系の信号雑音比向上に向けて新たな光検出法を提案しその有用性を確認した。

光熱変換顕微鏡では図1のように2つのレーザー光(ポンプ光、プローブ光)を試料に入射し、レーザースポットを走査させながら各点での信号強度を記録し画像を再構成するが、細胞の縁など屈折率変化の大きい部分では、プローブ光が屈折され透過光強度が変動する。このとき透過光強度の変動により光検出回路の出力が飽和すると、高周波信号発生に伴う偽信号が生じ、また本来観測される信号が喪失するため画質が低下することが問題であった。本研究では光熱変換顕微鏡で用いているバランス型光検出器の回路構成を最適化することで、ダイナミックレンジを向上し出力の飽和を抑制した。それにより細胞の縁部分で大きな屈折率変化を示す球形の浮遊細胞を観察した際の画質低下を抑えることに成功し、特に細胞の縁に同在しているミトコンドリアをより鮮明に観察することができるようになった(図2)。

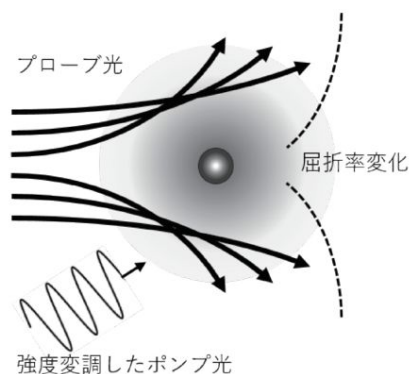


図1 光熱変換顕微鏡の原理

また光照射による細胞へのダメージを低減し、高感度・高速に計測するため、使用する光学素子を見直し入射光の波面収差を低減させた。さらに光利用効率の向上のため偏光素子を用いた空間分割バランス型光検出法を提案しその有用性を実証した。これらの改善により信号雑音比を数倍程向上することができ、生細胞内のミトコンドリアをより鮮明かつ高速に観察することができるようになった。

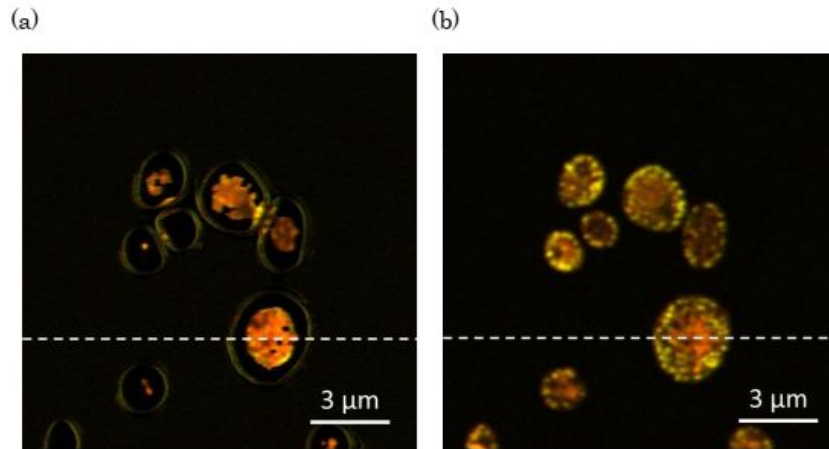


図2 (a)従来の光検出器と(b)新しい光検出器を用いた細胞の光熱変換イメージング

### (2) 同時多周波数同期検波法による高精度熱伝導計測法の開発

光熱変換顕微鏡では、強度変調したポンプ光を試料に入射し焦点近傍の温度および屈折率を周期的に変化させ、その変化をプローブ光により計測する。ポンプ光の変調周期が試料の熱伝導の時間より早くなると屈折率の変調度が小さくなる。そのため、ポンプ光の周波数応答から熱伝導率を計測することができる。

本研究では最初にポンプ光強度の変調周波数を変えながら画像を逐次取得し、試料の周波数応答を計測する手法を検討した。最初に金ナノ粒子を含水性ゲル中に分散させた試料を対象に計測し、信頼性の高い測定データが得られることを確認した。測定データから熱伝導係数を導出する解析法に関する課題が残されているが、現状でもマイクロスケールの熱拡散に関する定性的な議論ができることが確認できたため、生細胞を対象とした計測を行った。しかし画像の逐次的な計測の際に細胞内器官が動いてしまうため、複数画像間の対応が困難で正確な計測が難しいことが分かった。図3では異なる周波数で測定したミトコンドリア画像をRGBのカラー画像として表示しているが、逐次的な計測ではミトコンドリアが運動するために、画像間にずれがみられる。そのため当初の計画にもあった同時多周波数計測を試みた。同時多周波数計測では、全周波数の画像をシングルショットで計測するため、細胞内のミトコンドリアのような動的な測定対象でも、各周波数で位置ずれのない画像を得ることができることを確認した(図3)。一方で各周波数の信号強度は低下し、生細胞中のミトコンドリアを対象とした測定で信頼性の高いデータを得るには、さらなる信号雑音比の向上が必要であることが分かった。

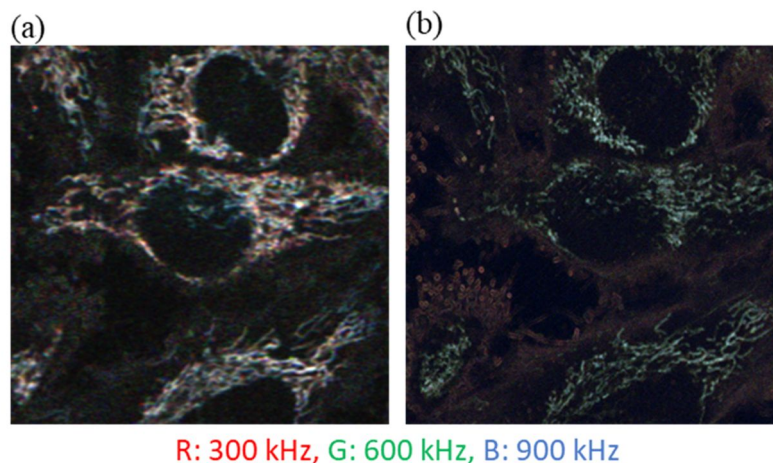


図3 (a)逐次計測法および(b)同時計測法による細胞の多周波数光熱変換イメージング

### (3) 生細胞を対象とした光熱変換イメージングと熱伝導率計測

近年、温度感受性の蛍光プローブを用いた測定から、細胞内のミトコンドリアから熱が産生され、ミトコンドリアには温度分布が存在することが指摘されている。ミトコンドリアには可視光を吸収する色素タンパク質であるシトクロムが含まれており、光熱変換顕微鏡によりシトクロムを検出することで、ミトコンドリアのイメージングが可能である。さらに光熱信号強度とポンプ光の強度変調周波数との関係から、ミトコンドリア近傍の熱伝導率の計測ができると考えら

れる。一方で、細胞内にはシトクロム以外にも可視光を吸収する分子が存在する。

本研究では細胞内のミトコンドリアの識別および選択的計測に向けて、光熱変換顕微鏡によりミトコンドリア以外の細胞器官が計測されているか検証を行った。異なる波長のレーザー光源を用いた同時2波長励起光熱変換顕微鏡を用いた細胞イメージングから、ミトコンドリアに加えて細胞内で不要なタンパク質などを分解する器官であるリソソームが検出されることが新たに分かった。また、リソソームの信号強度は栄養状態などの環境ストレスに依存することが分かった。本研究では、画像解析によるミトコンドリアとリソソームの識別法を検討し、さらにミトコンドリアの光熱信号が強くなる最適な培養条件を明らかにした。一方で、この結果は、従来は計測が困難であった環境ストレスに対する細胞応答の新しい計測法の確立に繋がると期待でき、細胞内代謝の解析へ向けた研究も平行して進めた。

最後に本研究で作製した同時多周波数計測光熱変換顕微鏡を用いて、ミトコンドリアの光熱信号の周波数特性を測定した。ミトコンドリアの光熱信号が小さいため、信頼性の高い結果を得るには測定系のさらなる改善が必要であるが、ミトコンドリアの各部分で光熱信号の周波数特性に大きな違いがみられないことが分かった。この結果は温度分布が存在するとする結果とは一致しておらず、原因についてさらなる検証が今後必要である。一方で、熱伝導率の高いカーボンナノチューブと比較したところ、ミトコンドリア近傍の熱伝導はナノチューブより小さいことを明確に示すことができた(図4)。極微スケールの熱物性は生物科学のみならず、電気・電子やナノ材料開発など多くの分野に関わる重要なテーマである。本研究で開発した光熱変換顕微法は、マイクロ・ナノスケールの熱伝導特性の評価法として材料科学研究の立場からも有用な測定技術になると期待される。

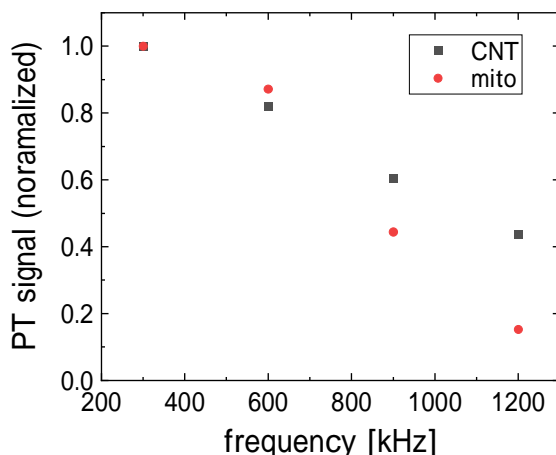


図4 ミトコンドリアとカーボンナノチューブの光熱信号の強度変調周波数依存性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 宮崎 淳	4. 巻 6
2. 論文標題 光熱変換顕微鏡による生細胞の無標識イメージング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 フォトニクスニュース	6. 最初と最後の頁 -
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 無
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 -
1. 著者名 宮崎 淳	4. 巻 49
2. 論文標題 生細胞の無標識イメージング -光熱変換顕微鏡で見るミトコンドリアとリソソーム-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 229
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 無
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 -
1. 著者名 Jun Miyazaki and Yasunobu Toumon	4. 巻 10
2. 論文標題 Label-free dynamic imaging of mitochondria and lysosomes within living cells via simultaneous dual-pump photothermal microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 5852 ~ 5852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1364/BOE.10.005852	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 -
1. 著者名 Jun Miyazaki and Yasunobu Toumon	4. 巻 430
2. 論文標題 Experimental evaluation of temperature increase and associated detection sensitivity in shot noise-limited photothermal microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Optics Communications	6. 最初と最後の頁 170-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.optcom.2018.08.007	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9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Jun Miyazaki and Yasunobu Toumon
2. 発表標題 Label-free dynamic imaging of mitochondria and related organelles inside live cells with simultaneous dual-wavelength photothermal microscopy
3. 学会等名 OPTICS and PHOTONICS International Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya Ishikawa and Jun Miyazaki,
2. 発表標題 Multi-Wavelength Absorption Contrast Imaging of Individual Single-Wall Carbon Nanotubes with Photothermal Microscopy
3. 学会等名 International Symposium on Imaging, Sensing, and Optical Memory 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Miyazaki
2. 発表標題 Photothermal Microscopy for High-sensitivity Absorption Imaging of Biological Tissues
3. 学会等名 International Symposium on Imaging, Sensing, and Optical Memory 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎淳
2. 発表標題 光熱変換顕微鏡による生物組織の高感度光吸収イメージング
3. 学会等名 レーザー学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎淳、東門泰伸
2. 発表標題 光熱変換顕微鏡によるミトコンドリアダイナミクスの無標識イメージング
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川祐裁、宮崎淳
2. 発表標題 同時2色光熱変換顕微イメージングによる単一単層カーボンナノチューブの解析
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川祐裁、宮崎淳
2. 発表標題 同時2色光熱変換顕微イメージングによる単一単層カーボンナノチューブの分析
3. 学会等名 第29回 光物性研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jun Miyazaki and Yasunobu Toumon
2. 発表標題 Label-free dynamic imaging of mitochondria and related organelles inside live cells with simultaneous dual-wavelength photothermal microscopy
3. 学会等名 OPTICS&PHOTONICS International Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎淳、岡本浩二
2. 発表標題 光熱変換顕微鏡による動物細胞の無標識オートファジー計測
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------