

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K18370
研究課題名(和文) 生体組織分子網羅的分析のための深紫外励起生体自家蛍光分光イメージング法の創出

研究課題名(英文) Comprehensive molecular analysis of biological tissues by deep-UV excitation autofluorescence hyperspectral imaging

研究代表者
熊本 康昭 (Kumamoto, Yasuaki)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：30611727
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織中の分子を非染色のまま網羅的顕微イメージングする方法を開発した。本手法では生体組織の自家蛍光を紫外励起し、生体中の自家蛍光性分子を同時励起し観察する。本手法によりラット肝臓組織を測定し得られたデータを解析した結果、レチノールやトリプトファンなど複数種の分子の組織内分布を染色することなく取得できた。また、正常肝と脂肪肝の組織とを測定し、本手法が肝疾患の分析・診断に有用である可能性を示した。さらに、以上の手法を実用上有用なものとする紫外励起蛍光ハイパースペクトルイメージング顕微鏡を開発した。この顕微鏡により染色や固定などの前処理をしていない生体組織の広範囲を高精細かつ高速に測定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
細胞や組織を構成する膨大な種類の分子の多くを観察することができれば、多種多様な物質が織りなす生物の活動や機能及び状態をより深く理解できるようになる。本研究はそのような観察を可能にするための顕微鏡を開発し、それが肝疾患の理解や診断に役立つ可能性を示した。また、顕微鏡の設計を工夫したことにより、医学・生物学応用において重要となる広範囲の高速・高精細測定を可能にした。このように本研究の成果は、新しい顕微鏡法を開発しその医学・生物学応用の可能性を示した点に、学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：I developed a comprehensive molecular imaging method for analyzing biological tissue without labeling. In this method, tissue autofluorescence is excited with ultraviolet light and intrinsically fluorescent molecules are simultaneously excited and comprehensively measured. By measuring rat liver tissue with this method and analyzing the data acquired, I have succeeded multicolor imaging of distributions of various molecules such as retinol and tryptophan in the liver tissue without labeling. Additionally, by measuring and comparing normal and fatty liver tissues, I have found the method as potentially useful for analyzing and diagnosing liver disease. I have also developed a practically useful microscope enabling fluorescence hyperspectral imaging at ultraviolet excitation. This microscope has allowed a fast measurement of biological tissue without such pretreatment as staining and fixation with a wide field of view as well as a high spatial resolution.

研究分野：工学、応用物理学、光学、紫外光学、分光学、顕微鏡光学、生体医用光学

キーワード：紫外光 分子イメージング マルチカラー 自家蛍光 顕微鏡 多変量解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命体の活動や機能、状態を理解するには生体を物質レベルで分析する必要がある。核酸やタンパク質のシーケンサーは試料を分子網羅的に分析でき生物の理解に不可欠である一方で、試料の空間情報を得られない。試料の空間情報を取得するため生命科学の分野では蛍光顕微鏡がよく利用される。蛍光顕微鏡を利用すれば複数の観察したい分子やイオンの分布を同時観察できる。しかし蛍光顕微鏡の土台となる蛍光標識は分子の動きや機能に影響を与える。またその際必要となる固定や細胞膜透過処理などの前処理も観察結果を左右する。このような背景のもと前処理を必要としない非染色生体分子イメージング法が近年研究されている。中でも分子網羅的分析を行える質量分析法、ラマン散乱分光法、レーザー誘起ブレイクダウン分光法を応用したイメージング法は装置開発研究だけでなく生命科学者による応用研究にも使われるようになってきている。しかしこれらの手法では計測する信号が微弱であり、微弱な信号を時間をかけて積算するため測定に時間を要する。また、細胞や組織に微量しか存在しない分子を精密かつ詳細に分析することは容易ではない。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて本研究では、非染色生体試料を高速に分子網羅的イメージングできる分析法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために着目した手法は深紫外励起自家蛍光分光法である。生体分子の多くは可視域では無色透明であるが、紫外域特に波長 300nm 以下の深紫外域においては吸収帯を有する。深紫外光を吸収する物質のうちの一部は、深紫外光励起により蛍光 (=自家蛍光) を発する。自家蛍光は強いいためその測定には長い信号積算時間を必要としない。またその他の非染色分子分析法では困難な微量の分子をも測定できる。細胞や組織に存在する自家蛍光物質は FAD、NADH、セロトニン、ビタミン、トリプトファン、葉酸、レチノールなど 100 種類以上知られている。深紫外励起自家蛍光分光法ではこれらの自家蛍光分子のみが観察対象となるが、自家蛍光物質の多くは生物の活動、機能、及び状態と密接に関わっており、疾患 (腫瘍、肝炎など) の検出や細胞状態 (pH、温度など) の評価にも応用されている。

以上を踏まえ本研究では深紫外励起自家蛍光分光法を顕微鏡技術と融合した深紫外励起生体自家蛍光分光イメージング法を開発する。測定を高速に行えるようライン照明を用いる。

4. 研究成果

本研究の成果として、1) 深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置の開発、2) 開発手法による非染色生体組織の広視野観察、および 3) 紫外・深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置の開発について、以下の通り報告する。

1) 深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置の開発

図 1 は開発した装置の概略図である。励起光は波長 275nm の LED 光源 (76 mW/sr, 大興製作所) である。光源から発した拡散光をレンズにより収集しスリットに結像させることにより、ライン状励起ビームを生成した。この励起ビームをダイクロイックミラーにより反射したのち結像レンズと対物レンズにより試料に投影した。試料から発した蛍光は対物レンズと結像レンズにより分光器 (MS3540i, SOL Instruments) の入射スリット上に投影される。分光された蛍光は 2 次元 CCD カメラ (Newton 920, Andor) によりライン照明上の空間分布とスペクトルの 2 次元デー

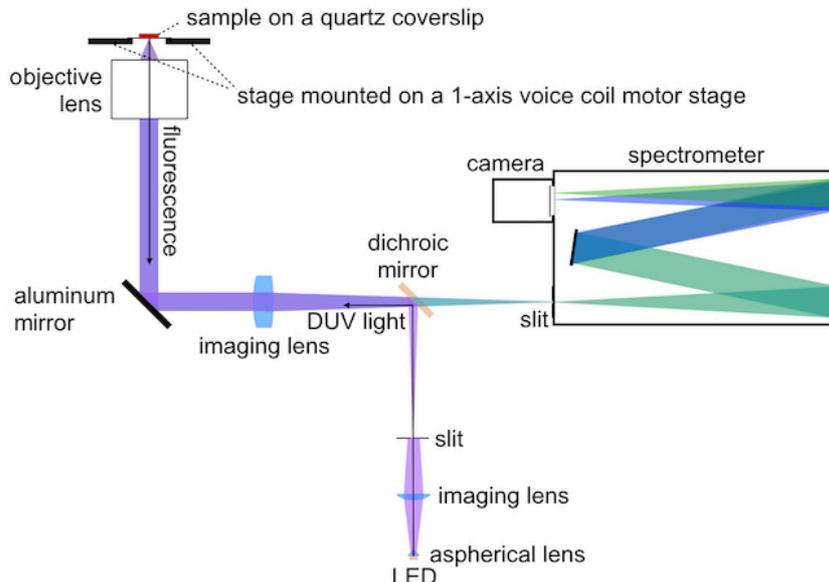


図 1 深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置の概略

タとして記録される。試料を電動ステージ (B18-120, THK プレシジョン) により微小距離だけ変位させ測定する、という操作を繰り返し行うことにより、空間2次元とスペクトルの3次元情報を有する蛍光ハイパースペクトルイメージングデータが取得される。なお、蛍光は励起波長より長波長のため、ダイクロイックミラーを透過する。

この測定では、試料ステージの変位とカメラの露光とを反同期させる必要がある。また、カメラの信号読み出しやステージの変位のあいだの不要な試料への光照射を防ぐため、試料の照明とカメラの露光とを同期させる必要もある。これらの同期、反同期を実現するため、LED ドライバー、CCD カメラ、およびステージを単一の矩形パルスにより駆動するシステムを構築した。このシステムにおいてステージはパルスの立ち下がりに応答し、他の2つの機器はパルスの立ち下がりに応答するようプログラムした。これによりステージとその他の機器を単一のパルスにより反同期させた。パルス発生にはパルスジェネレータ (SEN-3301, Nihon Kohden) を用いた。

以上の装置・システムにより培養ヒト乳がん細胞を測定した。得られたスペクトルと蛍光画像とを図2に示す。これらの細胞ではHoechst33342と Tb^{3+} によりそれぞれDNAとRNAとが染色されている。Hoechstの蛍光 ($\lambda = 470$ nm) と Tb^{3+} の蛍光 ($\lambda = 490, 545$ nm) のバンドがスペクトルにおいて確認できた。それぞれの波長の強度分布により構築した蛍光画像では、主に核質に分布するDNAと、核小体と細胞質に分布するRNAとが確認できた。

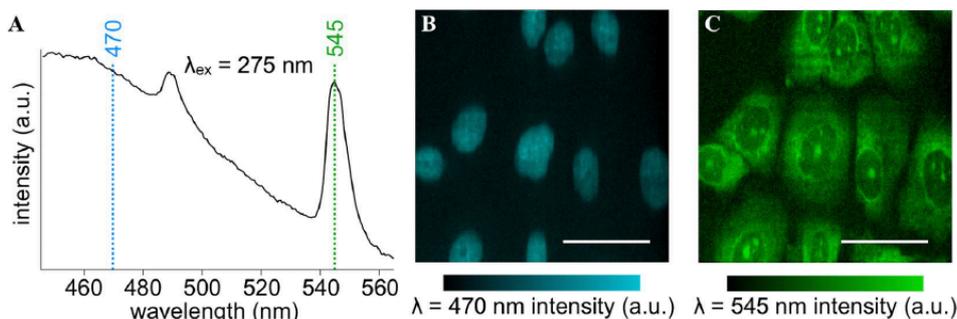


図2 深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置により得られた染色細胞のスペクトルと蛍光画像。Kumamoto, et al., Sci. Rep. 9, 10745 (2019)より許可を得て転載。

上記細胞の測定では励起スリットは $25 \mu\text{m}$ とした。この大きさは試料面において $0.9 \mu\text{m}$ 幅のライン状ビームを生成した。ステージの変位幅は $0.57 \mu\text{m}$ としており、上記測定は $1 \mu\text{m}$ 程度の空間分解能で行えたといえる。また、CCDカメラ1フレームの露光時間は0.5秒、読み出しレートは1 MHz、測定ライン数は256としており、データ取得に要した時間はわずか2分半であった。

2) 開発手法による非染色生体組織の広視野観察

生体組織を広視野観察するため対物レンズを40xから15xにかえた。生体組織試料は、京都府立医科大学動物実験委員会により承認された実験計画に従い、通常食を給餌された健常ラットから摘出した肝臓組織を用いた。図3はラット摘出正常肝の $3.3 \text{ mm} \times 0.4 \text{ mm}$ 範囲を深紫外励起蛍光スペクトルイメージングした結果である。図に示すのは2つの特徴的な空間分布による疑似カラー広視野画像、その一部の拡大画像、および代表的スペクトルである。緑色で示している分布は波長490nmの強度分布であり、主に肝細胞の間にまばらに存在していることとその蛍光スペクトルからレンチノールと推定される。一方青色は波長370nmの強度分布であり、その蛍光ス

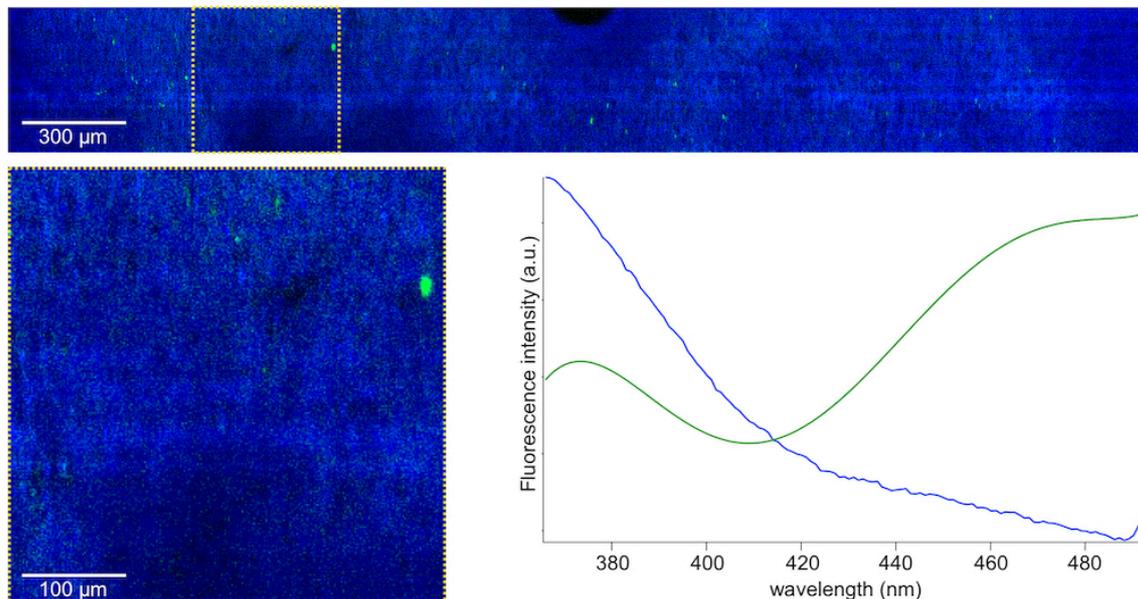


図3 ラット正常肝の広視野深紫外励起蛍光スペクトルイメージングの結果

ペクトルからトリプトファンと推定される。

レチノールは波長 360nm 付近の紫外光により効率よく蛍光励起される。これを踏まえ波長 375nm 励起蛍光スペクトルイメージング装置を開発した。波長 375nm 励起用と波長 275nm 励起用の装置の違いは光源の波長とダイクロイックミラーのカットオフ波長である。

波長 375nm 励起の光学系によりラット肝臓組織を観察した結果を図 4 に示す。緑色で示している分布は波長 490nm の強度分布でありレチノールである。そのコントラストは波長 275nm 励起のときよりはるかに高い。一方青色は波長 430nm の強度分布である。この分布に対応する分子は波長 460nm 付近に蛍光ピークをもつ NADH の可能性がある。波長 375nm 励起ではトリプトファンは観察されない。

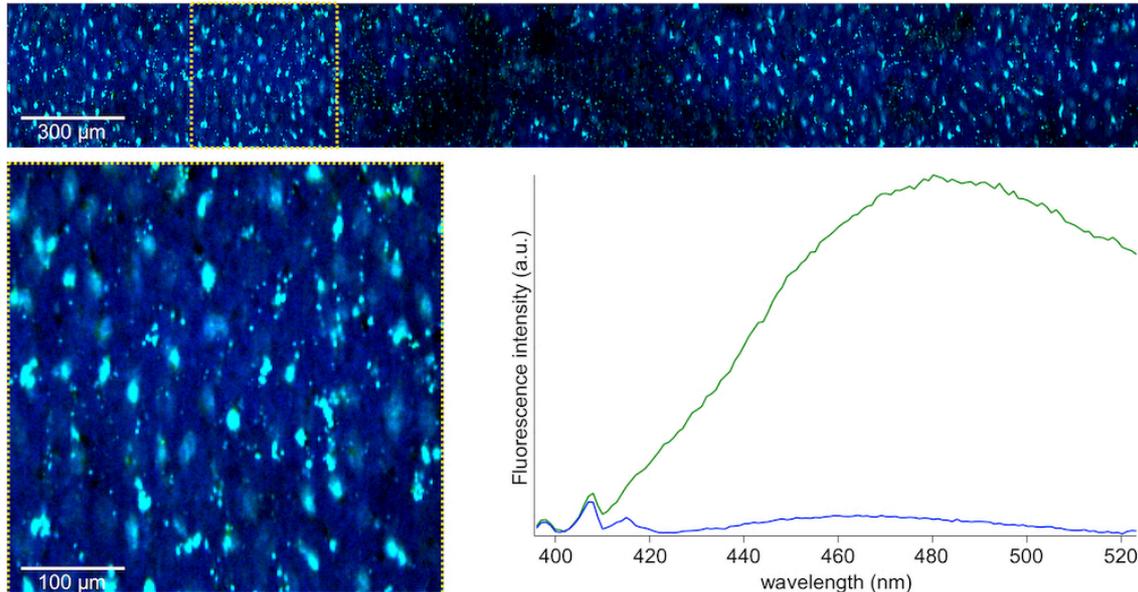


図 4 ラット正常肝の波長 375nm 励起蛍光スペクトルイメージングの結果

レチノールは肝臓の星細胞に局在し、脂肪蓄積による星細胞の活性化とともに減少する。そこで波長 375nm 励起の光学系により脂肪肝組織の測定も行った。脂肪肝組織は、京都府立医科大学動物実験委員会により承認された実験計画に従い、高脂肪・コレステロール食を給餌された脂肪肝ラットから摘出した。図 5 はラット脂肪肝組織を測定した結果である。図 4 と比較すると、脂肪肝組織ではレチノールの顕著な減少が確認できた。この結果から、紫外励起蛍光スペクトルイメージング法により肝臓の星細胞の活性化を評価できることが示唆された。



図 5 ラット脂肪肝の波長 375nm 励起蛍光スペクトルイメージングの結果

3) 紫外・深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置の開発

波長 275nm 励起と波長 375nm 励起とでは肝臓組織において観察できる分子に違いがみられた。そこでこれら 2つの波長を励起光として利用できる紫外・深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置を開発した。励起波長の切り替えに伴う煩雑な光学系の調整を不要とするため、励起光と蛍光の分離はビームスプリッターにより行なった。2つの励起ビームは励起スリットより前の光路において同軸となるようにした。波長 375nm 励起では分光器の前にロングパスフィルターを配置した。

紫外・深紫外励起蛍光スペクトルイメージング装置を用いて脂肪肝組織の測定を行った。使用した試料は、京都府立医科大学動物実験委員会により承認された実験計画に従い高脂肪食または高脂肪・コレステロール食を給餌された脂肪肝ラットから摘出した肝臓組織の凍結切片である。それぞれの組織の病理画像と蛍光画像を図 6 に示す。病理画像よりそれぞれの組織は、脂肪が蓄積した単純性脂肪肝（左）、脂肪の蓄積とそれに伴う線維化が存在する脂肪性肝炎（右）であることがわかった。また蛍光画像より 2つの励起波長により試料の同じ場所を観察できたことがわかった。またそれぞれの励起波長により得られた蛍光画像からは、組織の形態や蛍光体の分布も確認できた。今後これらスペクトルデータの詳細な解析を進めることにより脂肪肝の線維化を評価できると予想される。

謝辞：京都府立医科大学・原田義規先生、同・望月健太郎先生、同・竹村雅至先生には試料作製においてご協力いただきました。こころより感謝いたします。

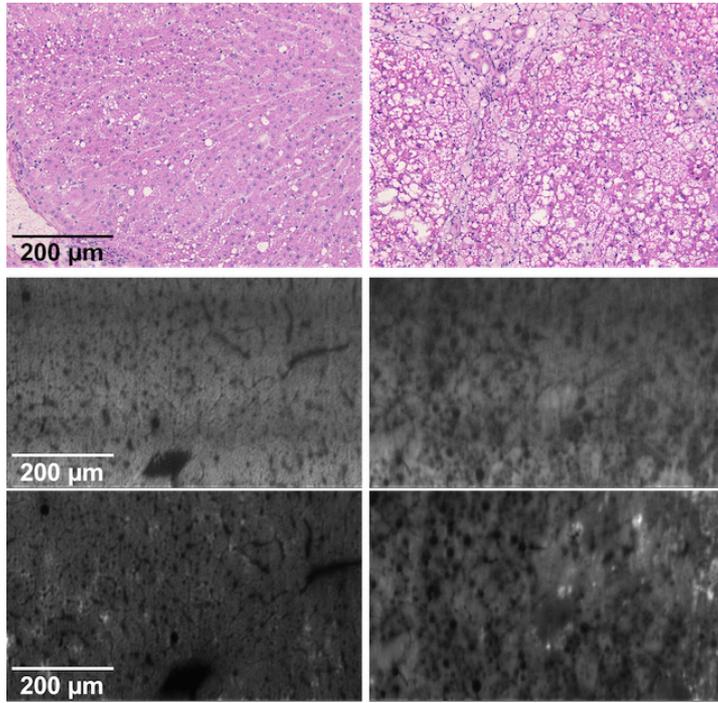


図 6 脂肪肝ラットから摘出した肝臓組織の凍結切片。上段は病理画像、中段は波長 275nm 励起蛍光画像（蛍光波長 296-422nm）、下段は波長 375nm 励起蛍光画像（蛍光波長 396-522nm）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kumamoto Yasuaki, Taguchi Atsushi, Kawata Satoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Deep Ultraviolet Biomolecular Imaging and Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Optical Materials	6. 最初と最後の頁 1801099 ~ 1801099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adom.201801099	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 -

1. 著者名 Kumamoto Yasuaki, Matsumoto Tatsuya, Tanaka Hideo, Takamatsu Tetsuro	4. 巻 9
2. 論文標題 Terbium ion as RNA tag for slide-free pathology with deep-ultraviolet excitation fluorescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10745 ~ 10745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47353-8	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 Matsumoto Tatsuya, Niioka Hirohiko, Kumamoto Yasuaki, Sato Junya, Inamori Osamu, Nakao Ryuta, Harada Yoshinori, Konishi Eiichi, Otsuji Eigo, Tanaka Hideo, Miyake Jun, Takamatsu Tetsuro	4. 巻 9
2. 論文標題 Deep-UV excitation fluorescence microscopy for detection of lymph node metastasis using deep neural network	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16912-16912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53405-w	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9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 熊本康昭, 松本辰也, 田中秀央, 高松哲郎
2. 発表標題 非薄切標本の組織病理学的観察を可能にする深紫外光励起蛍光イメージング法
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本康昭
2. 発表標題 希土類イオンによる深紫外生体医用分光学の開拓
3. 学会等名 2019年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuaki Kumamoto
2. 発表標題 Deep-UV bioimaging of cells and tissues by terbium ions
3. 学会等名 SPIE Optics + Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本康昭, 松本辰也, 田中秀央, 高松哲郎
2. 発表標題 テルビウムイオンを用いた深紫外励起蛍光RNAイメージング
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本康昭
2. 発表標題 深紫外励起テルビウム蛍光による転移リンパ節イメージング
3. 学会等名 第17回医用分光学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuaki kumamoto
2. 発表標題 Biological imaging with deep-UV light by lanthanide ions
3. 学会等名 OptoX-NANO 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuaki Kumamoto
2. 発表標題 Biological imaging with deep-UV light by lanthanide ions
3. 学会等名 Core-to-Core Symposium "Global Nanophotonics 2019" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuaki Kumamoto, Tatsuya Matsumoto, Hideo Tanaka, Tetsuro Takamatsu
2. 発表標題 Terbium ion as RNA tag for slide-free histology with deep-ultraviolet excitation fluorescence
3. 学会等名 SPIE Photonics West (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本康昭, 松本辰也, 田中秀央, 高松哲郎
2. 発表標題 深紫外励起蛍光イメージングによる癌リンパ節転移の迅速検出
3. 学会等名 光・量子デバイス研究会
4. 発表年 2019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
研究協力者	原田 義規 (Harada Yoshinori)		
研究協力者	望月 健太郎 (Mochizuki Kentaro)		
研究協力者	竹村 雅至 (Takemura Masashi)		