

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02626

研究課題名（和文）従来の限界を超えた空間分解能で生体組織深部を可視化する無標識分子イメージング

研究課題名（英文）Development of a label-free imaging technique of biological tissue specimens with high spatial resolution beyond the conventional limitation

研究代表者

山中 真仁（Yamanaka, Masahito）

大阪大学・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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体試料組織試料や生体組織に近い構造をもつオルガノイドなどのサンプル内部の高空間分解能観察を目的とし、生体透過性の高い第2、3の生体窓の光を用いた誘導ラマン散乱顕微鏡用の低ノイズ・高出力パルス光源の開発およびその光源を用いた顕微鏡システムの開発に取り組んだ。さらに、開発した光源が、誘導ラマン散乱以外の観察モダリティにも有用であることを確認し、複数の情報を同時に観察できるマルチモーダルイメージング技術を実現できる見通しを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生命科学の研究において、生体組織に近い環境で作製されたオルガノイドやスフェロイドといった厚みのあるサンプルが盛んに用いられている。さらに、これらのサンプルは創薬などといった医学分野でも利用が広がっている。生体透過性の高い生体窓の光を用いたバイオイメージング技術の開発はこのようなサンプル内部を詳細な観察を可能とするもので、生命科学や医学分野の研究において有用な技術となりえる。

研究成果の概要（英文）：In this study, our research target is to develop a high spatial resolution imaging technique to allow us to observe the deep insides of thick biological specimens such as organoids and spheroids, which have similar morphologies to those of actual tissue specimens. For this purpose, we developed the low noise and high power laser source in the second and third near-infrared windows. Then we tackled developing a high-resolution stimulated Raman microscopy system with the developed laser source. In addition to the original purpose, we also found out that our laser source is also useful for other optical imaging modalities such as fluorescence microscopy and had a prospect of realizing a multimodal imaging technique to achieve multiple biological information simultaneously.

研究分野：応用計測光学

キーワード：深部イメージング 高空間分解能 生体窓 ラマン散乱 蛍光

1. 研究開始当初の背景

生体内と異なる環境で培養された細胞では、本来の細胞活性や機能を喪失しているケースが多数報告されている[1]。近年、生体内で生じる生命現象を観察し、解析するため、実際の生体組織に近い環境(3次元培養環境など)で作製されたオルガノイドやスフェロイドなどといった厚みのあるサンプルが用いられることが多くなっており、そのような厚みのあるサンプル内部を詳細に観察できる技術の必要性が益々高くなっている。

光学イメージング技術を用いて厚みのある生体試料を観察する際には、第1、第2の生体窓と呼ばれる波長 650-950 nm 帯や波長 1000-1350 nm 帯の近赤外光が利用されている。近年、我々の研究では、生体試料中において光散乱係数が低く、さらに水の吸収係数の極小値が存在する波長 1550-1850 nm 帯に着目し、波長 1700 nm 帯光コヒーレンス顕微鏡を開発し、波長 1550-1850 nm 帯が深部・高空間分解能観察に有用であることを示してきた[2、3] この波長 1550-1850 nm 帯は近年、第3の生体窓と呼ばれるようになってきている(または、波長 1000-1350 nm を第2aの生体窓、波長 1550-1850 nm 帯を第2bの生体窓、もしくは波長 1000-1850 nm をまとめて第2の生体窓と呼んでいるグループもある)[4、5]。

従来、生体試料の観察には、蛍光タンパク質や蛍光分子を利用した蛍光イメージングが主に利用されてきた。近年では、数 10-150 nm 程度の高い空間分解能で試料を観察できる超解像蛍光イメージング技術も利用されるようになってきている。さらに、近赤外光による2光子励起などを利用した蛍光顕微鏡を用いれば、生体試料深部の3次元構造を詳細に観察できる。しかしながら、蛍光イメージングはこのように生体構造や分子情報の観察に非常に有用な手法であるが、蛍光プローブを試料に導入する場合、生体や細胞などの挙動を変質させる可能性がある[6]。

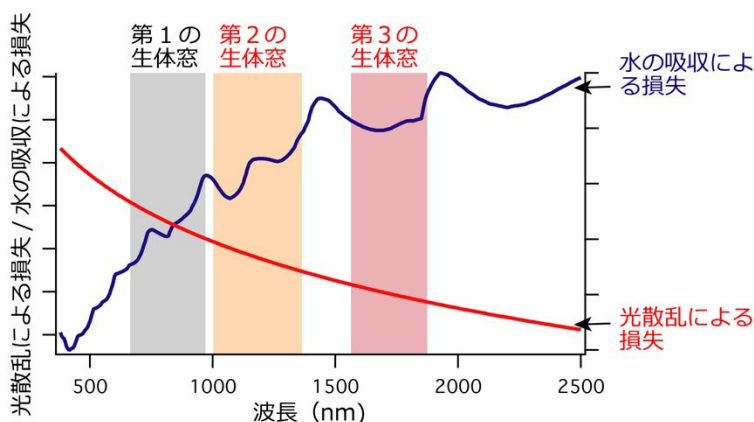


図1：生体窓と呼ばれる波長帯

2. 研究の目的

本研究では、生体組織試料や生体組織に極めて近い構造をもつオルガノイドの内部を高空間分解能かつ無標識で可視化することを目的とし、生体透過性の高い第2、3の生体窓と呼ばれる近赤外光、構造化照明技術および誘導ラマン散乱顕微鏡イメージング技術を活用した、無標識・深部・高空間分解能技術の開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究の流れは、誘導ラマン散乱顕微鏡システムを構築するため、第2および第3の生体窓の波長域で低ノイズピコ秒パルス光を生成できるロバストなファイバレーザ光源を開発し、その後、開発した光源を用いた誘導ラマン散乱顕微鏡装置の開発に着手するというものである。第2および第3の生体窓の低ノイズピコ秒パルス光を生成する光源は当時存在せず、本研究目的の実現には必須かつ重要な開発項目である。

4. 研究成果

誘導ラマン散乱イメージング用には、波長が異なる2色のパルス光が必要である。本研究では、 3000cm^{-1} あたりのラマン信号検出を念頭に置き、波長 1050-1100 nm 帯および波長 1550-1650 nm 帯のピコ秒パルス光を生成できるファイバレーザ光源の開発に取り組んだ。開発した光源では、単一のフェムト秒エルビウム添加ファイバレーザ光源をシード光として用いる。シード光源も本研究で開発したものであり、単層カーボンナノチューブをモードロッカーとして用いるオールファイバー式のフェムト秒パルス光源であり、なおかつ共振器に使用したファイバはすべて偏波保持タイプのものであるため、外乱に強く、安定性の高い光源と言える。出力光の中心

波長は 1555 nm で、繰り返し周波数は 76 MHz に調整した。シード光の波長から波長 1600 nm 帯付近の高出力パルス光を得るため、シード光源の後段にエルビウム添加ファイバ増幅器を接続することで、パルス光出力の増強を行いつつ、ファイバ中におけるラマン散乱効果によるソリトン自己周波数シフト(波長シフト)を利用することで波長シフトを行った。今回使用したファイバ増幅器は、波長 1600 nm 帯を増幅しやすいエルビウム添加ファイバを選定し開発したものであり、増幅器へ入射するパルス光のチャープおよび増幅器自信の群速度分散値を調整することで(シミラリトン増幅器と呼ばれるファイバ増幅器)効率がよい周波数シフトが得られる構成となっている。増幅器に使用したエルビウム添加ファイバ長を調整した後、増幅器後の波長および出力を確認したところ、波長 1650 nm 中心かつ出力 200 mW を超えるパルス光が得られていることが確認できている。誘導ラマン散乱イメージングでは、誘導ラマン散乱効果によって得られる微小な信号変調を検出するため、検出波長を生成する光源には、低ノイズ性が要求される。本研究では、波長 1550-1650 nm 帯を検出光をして検討しており、開発したシード光源の出力および増幅器後の出力をそれぞれ強度ノイズ評価用フォトディテクターを用いて計測し、ノイズレベルを評価した。その結果、シード光源出力では、2 MHz 帯ではレーザーパワーの上昇とともに、急激にノイズレベルが上昇したものの、8 MHz 帯ではショットノイズレベルから数 dB 程度といったレベルにノイズが抑制されていることが確認できた。この結果から、検出光が 8 MHz 以上で強度変調されていれば、誘導ラマン散乱信号を計測できることが期待できる。また、増幅器後では、増幅効果によるノイズレベルの上昇は確認できたものの、ノイズレベルの大幅な上昇は避けられており、誘導ラマン散乱イメージングに使用できるレベルの波長 1600 nm 帯光が生成できたことが確認できた。波長 1050-1100 nm 帯光の生成には、波長 1600 nm 帯と同様にエルビウム添加ファイバを用いたシミラリトン増幅器を開発し、使用した。シード光源からの出力光をファイバカップラで 2 分岐し、片方を前述の波長 1550-1650 nm 帯パルス光、もう一方を 1050-1100 nm 帯光生成に利用する構成となっている。シミラリトン増幅器を用いることで、線形に近いチャープを有する増幅光が得られるため、増幅器後も簡易な分散補償で極短パルス光(60 fsec 程度)を生成できる。本研究では、シミラリトン増幅器後に 60 fsec 程度の波長 1600 nm 帯パルス光を生成し、その極短パルス光を高非線形ファイバと呼ばれるコア径の小さなファイバに入射させることで、波長 1050-1100 nm 帯までカバーする広帯域光を生成した。その後、バンドパスフィルターで波長 1050-1100 nm 帯の所望の波長のみを抽出し、イッテルビウム添加ファイバ増幅器で増幅することで十分な光量の波長 1050-1100 nm 帯ピコ秒パルスレーザーを生成した。開発した 2 波長生成ファイバレーザー光源を用いて構築を進めた誘導ラマン散乱顕微鏡システムは、2 軸のガルバノミラーを用いて試料を走査するレーザー走査型誘導ラマン散乱顕微鏡であり、透過光を検出する構成となっている。また、電動のステージを利用することで、奥行方向の走査を行い、試料の 3 次元イメージも取得する。使用する励起波長はファイバレーザー光源中に配置したバンドパスフィルタを調整することで可変することができる。これまでの実験結果から、開発した 2 波長出力ファイバレーザー光源の出力やノイズレベルをさらに改善していけば、第 3 の生体窓の光を用いた信号対ノイズ比の高い高空間分解能・誘導ラマン散乱イメージングを十分に行えるという感触を得ている。

本研究では、誘導ラマン散乱イメージング用途として、エルビウム添加ファイバを用いたシード光源およびシミラリトン増幅器を開発し、利用した。シミラリトン増幅器では前述の通り、60fsec 程度の極短パルス光を生成できるため、2 光子励起蛍光顕微鏡に使用してみたところ、高効率に近赤外蛍光プローブを励起できることが確認できた。生体模擬試料越しに近赤外プローブを導入した細胞試料を観察したところ、2 mm 以上深部まで観察できることが確認できており、本研究で開発した光源技術が 2 光子励起蛍光顕微鏡にも非常に有用なものであることが確認できている。今回行った実験では、誘導ラマン散乱イメージング用に開発した光源をそのまま用いて測定を行ったが、2 光子励起用に繰り返し周波数、パルス幅、パルス光の中心波長、光学系などを最適化することで、2 光子励起蛍光イメージングのクオリティを改善できる余地が十分に残っている。このため、本研究で開発した光源に、2 光子励起蛍光イメージング用の増幅器を増設すれば、誘導ラマン散乱および 2 光子励起蛍光イメージングを同時に行うことができ、より多くの情報を得ることができる。

本研究の第 2、第 3 の生体窓の誘導ラマン散乱顕微鏡や前述の 2 光子励起蛍光顕微鏡は、これまでに我々の研究で開発してきた光コヒーレンス顕微鏡とも容易に組み合わせることが出来る。本研究で開発した光源技術を用いたものではないが、第 3 の生体窓の光を用いた 2 光子励起蛍光顕微鏡と光コヒーレンス顕微鏡を組み合わせ、蛍光と光散乱・反射を用いたマルチモーダルイメージングを行えることは、我々の研究で実証している。本研究で取り組んだ開発内容を更に発展させていけば、複数の分子情報や構造情報を同時に可視化することができる第 2、第 3 の生体窓イメージング技術を実現していけるという見通しがたっている。

< 引用文献 >

- F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(10), 839-845 (2007)
- 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)

- 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**(8), 085002 (2017)
- L. Shi, L. A. Sordillo, A. Rodriguez-Contreras, and R. Alfano, "Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging," *J. Biophotonics* **9**(1-2), 38-43 (2016)
- F. Wang, H. Wan, Z. Ma *et al.* "Light-sheet microscopy in the near-infrared II window," *Nat Methods* **16**, 545–552 (2019).
- M. Okada, N. I. Smith, A. F. Palonpon, and K. Fujita, "Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 28-32 (2012)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 園山 大地、山中 真仁、湯川 博、宮地 冬、徳永 真登、馬場 嘉信、西澤 典彦 |
| 2. 発表標題 第3の生体窓 (NIR3) 波長の超短パルス光による量子ドットの2光子励起・近赤外発光を用いた生体深部イメージング |
| 3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 園山大地, 山中真仁, 湯川博, 徳永真登, 馬場嘉信, 榊原陽一, 面田恵美子, 片浦弘道, 西澤典彦 |
| 2. 発表標題 第3の生体窓(NIR3)波長の超短パルス光による量子ドットの2光子励起・近赤外発光を用いた生体深部イメージング |
| 3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 園山大地、山中真仁、湯川博、徳永真登、馬場嘉信、榊原陽一、面田恵美子、片浦弘道、西澤典彦 |
| 2. 発表標題 第3の生体窓(NIR3)波長の超短パルス光による量子ドットの2光子励起・近赤外発光を用いた生体深部イメージング |
| 3. 学会等名 レーザー学会第558回研究会「次世代ファイバレーザー技術」 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 園山大地、山中真仁、湯川博、徳永真登、馬場嘉信、榊原陽一、面田恵美子、片浦弘道、西澤典彦 |
| 2. 発表標題 第3の生体窓(NIR3)波長の超短パルス光による2光子励起・近赤外発光を用いた生体深部イメージング |
| 3. 学会等名 2021年度レーザー学会中部支部若手研究発表会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山中真仁、園山大地、湯川博、徳永真澄、馬場嘉信、西澤典彦 |
| 2. 発表標題 第3の生体窓(NIR-3)波長の超短パルス光を用いた2光子励起・近赤外発光を用いた生体深部イメージング |
| 3. 学会等名 レーザー顕微鏡研究会第46回講演会・シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山中真仁、園山大地、湯川博、徳永真登、馬場嘉信、西澤典彦 |
| 2. 発表標題 第3の生体窓の光を利用した生体イメージング |
| 3. 学会等名 レーザー学会 学術講演会 第42会年次大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 山中真仁 |
| 2. 発表標題 近赤外顕微イメージングの基礎と最新の動向 |
| 3. 学会等名 第31回基礎及び最新の分析化学講習会（招待講演） |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|