

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22961

研究課題名（和文）第3生体窓の光で誘起する非線形光学効果を用いた深部高空間分解能光音響イメージング

研究課題名（英文）High resolution photoacoustic microscopy for deep tissue imaging by using nonlinear responses induced with third near-infrared light

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体透過性の高い生体窓の光、希土類イオンが示す非線形な光学応答、および光音響イメージング技術を活用し、生体深部を高空間分解能で可視化する技術の開発に取り組んだ。その結果、複数の希土類イオンにおいて、光音響信号を得ることに成功し、光音響イメージングの取得もできることも確認している。また、励起光強度をコントロールすることで、希土類イオンの高次の光学応答を誘起できることも確認しており、光音響信号を用いた深部イメージングの高空間分解能化の見通しを得ることができている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生体組織や生体内部の詳細な状況を可視化できる技術の実現に向け、光音響イメージング技術をベースとした内容で深部・高空間分解能イメージングの実現に向け見通しをたてることが出来るものである。第3の生体窓の光は未だ使用例が少なく、光学素子や光学プローブ分子などの面で現状は不利な点が多いが、近年の状況を鑑みれば近い将来、この点については大幅に状況が改善されるものと期待できる。第3の生体窓の光を積極的に活用する技術は、近い将来、生命科学や医学分野の様々な研究における深部解析を支える技術の一つになると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We tackled developing a cellular level resolution and deep tissue imaging technique by using near infrared light in the optical tissue windows, nonlinear optical responses of lanthanide ions, and photoacoustic imaging technique. We confirmed that it is possible to induce photoacoustic signals with multiple lanthanide ions. We also achieved photoacoustic images with lanthanide ion samples. In addition, we also confirmed that, by using appropriate excitation power, nonlinear optical responses are achieved with lanthanide ions. These results indicated that the use of near infrared light in the optical tissue window and lanthanide ions for photoacoustic imaging has a great potential to realize high-resolution deep tissue imaging.

研究分野：応用計測光学

キーワード：深部イメージング 光音響 生体窓 高空間分解能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体は多種多様な細胞および組織で構成されており、組織だけでなく、空間・時間的な形態変化や分子挙動を細胞レベルで解析できれば、生命科学の発展に大きく寄与できると考えられる。生体試料内部を観察する技術としては様々な技術が開発され、実用化されてきている。その中でも、特定の分子や組織を高いコントラストで観察したい場合、蛍光標識を利用した蛍光イメージング技術が主に用いられている。従来、生体試料の深部を観察する際には、生体透過性の高い近赤外光(波長 650-950 nm や 1000-1350 nm)が利用されており、それぞれの波長帯は第 1 および第 2 の生体窓と呼ばれている[1]。近年、これらの生体窓の光を照射することで蛍光発光が得られる近赤外蛍光標識が盛んに開発されている。赤色蛍光タンパク質、量子ドット、有機色素、カーボンナノチューブ、希土類添加ナノ粒子といった様々な標識が登場しており、第 2 および第 3 の生体窓(波長 1550-1850 nm 帯)で発光が得られるものも実用化されている[2-7]。近年、これらの近赤外蛍光プローブを用いた研究報告が多く見られるようになり、連続発振レーザーやランプ光源を用いた簡便な広視野蛍光顕微鏡装置で、マウスの臓器形態観察や頭蓋骨越しの脳内血管分布観察といった様々な *in vivo* イメージングが行われている。

2. 研究の目的

本研究では、生体透過性の第 3 の生体窓の光、希土類イオンが示す非線形な光学応答、および光音響トモグラフィ技術を活用し、生体試料深部を細胞レベルの空間分解能で可視化する技術を創出することを目標としている。

3. 研究の方法

光音響トモグラフィでは、分子が光吸収した際に生じる熱膨張が誘起する音波(光音響波)を検出することで、試料中の分子分布を高コントラストで観察できる。従来の光音響トモグラフィで深部観察を行う場合、数 MHz 程度の音響波を検出する機会が多いが、その場合、空間分解能は数 100 μm 程度であり、1 細胞レベルの観察は難しい。本研究では、光音響トモグラフィの空間分解能を向上するため、希土類イオンが示す高次非線形な光学応答を積極的に活用する。長波長ほど試料中における光散乱効率が下がり、生体中における集光スポットの劣化を抑制できるため、試料深部でも微小な集光スポットを維持できる。さらに、高次非線形な光学応答を顕著に誘起できるのは、集光スポットの中心付近に限られるため、高次非線形な光学応答に由来する光音響信号を検出できれば、集光スポットサイズ以下の高い空間分解能を実現できる。

本研究では、第 3 の生体窓の光を利用する光音響トモグラフィシステムを構築するため、光ファイバ技術を用いた光源を開発し、その後開発した光源を用いて光音響トモグラフィシステムの構築に着手した。

4. 研究成果

本研究では、当初、波長 1550 nm、繰り返し周波数 250 kHz、出力 400 mW のパルスレーザー(IMRA 製 FCPA)からの出力光をフォトニック結晶ファイバに入射させ、ファイバ中における誘導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)を利用し、第 3 の生体窓の中でもより生体透過性の高い波長 1600-1700 nm 帯の光を生成する予定であった。しかし、研究過程において、入手できるフォトニック結晶ファイバでは、非線形な効果が過剰に生じ、スペクトル波形が大幅に崩れ、第 3 の生体窓の波長帯域で十分なパワーのパルス光が得られないことが判明した。そこで代案として、波長 1550 nm のシード光を直接使用し、研究を進めた。これまでの名古屋大学西澤研究室(研究会指示の所属の研究室)の光コヒーレンストモグラフィに関する研究において、波長 1550 nm を用いた場合でも十分に生体試料深部まで観察できるという研究結果が得られており[8]、当初予定していた波長 1600-1700 nm 帯よりは観察可能深度が多少低下するものの、十分な深度まで観察を行える。本研究では、光音響顕微鏡装置の開発と並行し、第 3 の生体窓の光で光音響波を誘起できるプローブの探索・調査を行った。光音響トモグラフィおよびプローブの探索・調査は、分担研究者の大阪大学・新岡宏彦 特任准教授および佐賀大学・山岡禎久 准教授と連携し、進めた。

本研究の光音響顕微鏡システムは、水槽中に設置したサンプルに、対物レンズで励起光を集光し、集光位置からの光音響波信号を検出するという構成になっている。試料の XY 方向の走査には 2 軸のガルバノスキャナー、Z 軸走査には Z 軸ピエゾステージを利用している。これまでの我々の波長 1700 nm 帯光コヒーレンストモグラフィの研究過程において、生体の脂質などが波長 1550-1850 nm 帯に十分な 1 光子吸収を持つことを実験的に確認できており、プローブ分子を導入せずとも脂質などの分布は観察できる可能性が高い。試料中に導入したプローブ分子に励起光を照射し、高次非線形な光学応答を誘起した際に、その非線形な光学応答由来の光音響信号を選択的に抽出するため、本研究では励起光強度を時間的に単一周波数で正弦波状に強度変調するシステムを構築、導入した。光音響波信号が励起光強度に対し線形な応答を示すときには、光音響波信号強度は励起光の強度変調周波数と同様の周波数で変調を受ける。しかし、励起光強

度に対し、光音響波信号強度が飽和を示した場合、その関係は非線形となり、検出信号に非線形な応答由来の高調波信号成分が含まれるようになる。光音響波信号の非線形な応答は、励起光強度が大きい領域で顕著に生じるため、非線形な信号は主に集光スポット内やその付近で生じる。このため、検出された信号から高調波周波数成分を選択的に抽出すれば、集光スポット内やその付近で生じた非線形な信号のみを検出することができ、音響波の検出周波数がそれほど高周波数でなかったとしても、集光スポットサイズ程度の空間分解能が得られる。本研究では、ロックインアンプを用いることで、高周波数成分の抽出を行うシステムを構築した。

高次非線形な光学応答を誘起できるプローブの候補として、希土類イオンを選定し、試験を進めた。希土類の一つであるエルビウムは、波長 1550 nm の光を効率よく吸収する物質であり、波長 1550 nm の光子を 3 回 1 光子吸収するという過程を経て、発光する（アップコンバージョン発光と呼ばれる現象）。このため、分担研究者の佐賀大学の山岡研究室が開発している 2 光子励起・光音響波顕微鏡 [9、10] のように、非線形な信号誘起を行えるプローブであると期待した。実際、エルビウム添加ナノ粒子を用い、励起光と発光強度の関係を測定したところ、当初想定したような 3 乗の高次非線形な応答は得られなかったが、励起光強度を調整すれば 1.68 乗程度の高次非線形な応答が得られることが確認できた。3 乗の応答が得られなかった理由としては、エルビウムの各エネルギー準位の寿命が長く、飽和が生じてしまったためであると考えられる。高次非線形な応答が得られることが確認できた後に、エルビウムイオン溶液を用いて、光音響波信号が誘起できるかを確認したが、現在のところ未だ検出に十分な信号強度が得られていない状況である。現状、水溶液サンプルを利用したことによる溶液中における励起光信号強度減衰、および光学系の途中における励起光ロスが大きく、エルビウムサンプル中で十分な光量の光が確保できていないことが主な原因と考えられる。

前述のように波長 1550 nm 帯のプローブ候補としていたエルビウムイオンで検出に十分な信号量が得られていない状況を踏まえ、代案として第 2 の生体窓および第 1 の生体窓で励起することができる希土類イオンであるイッテルビウムイオン（波長 980 nm で励起可能）とネオジウムイオン（波長 800 nm 帯で励起可能）を用いて、希土類イオンで光音響波信号誘起が行えるかの確認、およびイメージング実験を進めた。その結果、従来の光音響波イメージングで広く使用実績がある蛍光分子であるインドシアニングリーンよりは信号強度は低いものの、十分にイメージングが行える信号強度を誘起できることを確認できた。この結果から、エルビウムでも水分含有量が少ないサンプルであれば、光音響波信号を検出可能なレベルで誘起できるという見通しが得られている。

前述の通り、近年、近赤外波長域の光を吸収し、蛍光発光が得られる近赤外蛍光プローブ分子が盛んに開発されており、年々選択肢が増えてきている。さらに、光音響イメージングには、蛍光発光しない分子やナノ粒子などもプローブとして使用できる。また、本研究で開発を進めてきた光音響イメージング技術は他の第 3 の生体窓波長帯のイメージング技術とも容易に融合することができる。例えば、我々の研究では、これまでに第 3 の生体窓の波長である波長 1700 nm 帯の光を利用した光コヒーレンス顕微鏡 [11-13] や光コヒーレンストモグラフィ [14] を開発に成功しており、マウス脳などの深部・高空間分解能観察に成功している。光コヒーレンス顕微鏡や近赤外蛍光イメージング技術と融合させることで、観察対象の構造、分子情報など様々な情報が一度に観察することができる。このように、本研究で開発を進めてきた技術を更に発展させていけば、生体深部のより有益な情報が得られるイメージングモダリティの実現が期待できる。

< 引用文献 >

- L. Shi et al., “Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging,” *J. Biophotonics* 9(1-2), 38-43 (2016)
- N. C. Shaner et al., “Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein,” *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572 (2004).
- G. Hong, A. L. Antaris, and H. Dai, “Near-infrared fluorophores for biomedical imaging,” *Nat. Biomed. Eng.* 1, 0010 (2017).
- A. L. Antaris et al., “A small-molecule dye for NIR-II imaging,” *Nat. Mater.* 15, 235–242 (2016).
- S. Kim et al., “Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping,” *Nat. Biotechnol.* 22, 93–97 (2004).
- G. Hong et al., “Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window,” *Nat. Photonics* 8, 723–730 (2014).
- E. Hemmer et al., “Upconverting and NIR emitting rare earth based nanostructures for NIR-bioimaging,” *Nanoscale* 5, 11339–11361 (2013).
- N. Nishizawa et al., “Real-time, ultrahigh-resolution, optical coherence tomography with an all-fiber, femtosecond fiber laser continuum at 1.5 μm ,” *Opt. Lett.* 29, 2846-2848 (2004).
- Y. Yamaoka et al., “Photoacoustic microscopy using ultrashort pulses with two different pulse durations,” *Opt. Express* 22, 17063-17072 (2014)
- Y. Yamaoka et al., “Fine depth resolution of two-photon absorption-induced photoacoustic microscopy using low-frequency bandpass filtering,” *Opt. Express* 19, 13365-13377 (2011)
- 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)
- M. Yamanaka et al., “Signal-to-background ratio and lateral resolution in deep tissue imaging by optical coherence microscopy in the 1700 nm spectral band,” *Sci. Rep.* 9, 16041 (2019)
- M. Yamanaka et al., “High-spatial resolution deep tissue imaging with spectral-domain optical

coherence microscopy in the 1700 nm spectral band,” *J. Biomed. Opt.* 24, 070502-1(2019)
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)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	新岡 宏彦 (Hirohiko Niioka) (70552074)	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) (14401)	
研究分担者	山岡 禎久 (Yoshihisa Yamaoka) (80405274)	佐賀大学・理工学部・准教授 (17201)	

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