

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680060

研究課題名(和文) 生体の非線形光学効果を利用した無染色イメージングの医療応用のための基礎基盤研究

研究課題名(英文) Label-free imaging technique based on nonlinear optics in biological tissues for medical application

研究代表者

大嶋 佑介(Oshima, Yusuke)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10586639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：光と分子の相互作用を利用して、細胞や組織などの生体内の分子が持つ機能やそのダイナミクスを可視化する光イメージング技術・分光計測技術は、医学・生物学分野において重要である。特に、非線形光学効果やラマン散乱という物理現象を利用することで、分子を標識することなくイメージングすることが可能である。本研究では、顕微鏡技術を基盤とした疾患診断システムへの応用を目指して、高感度ラマン分光イメージングシステムの開発を行った。さらに、種々の疾患モデルを用いた解析を行い、疾患にともなう生体の分子組成の変化を定量的に解析することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Optical imaging technique enables us to reveal molecular dynamics and their function in cells and tissues. Especially, Raman spectroscopy and nonlinear optical effect are applicable to label-free imaging of target molecules, therefore it is promising tool for biomedical applications. In this study, we developed high throughput Raman imaging system for clinical diagnostics and successfully evaluated nonlinear microscopy for quantitative analysis of changes in molecular component on animal disease models.

研究分野：医用光学

キーワード：無染色イメージング 第2高調波発生 ラマン分光 非線形光学 ラマンイメージング SHGイメージング 診断

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織にコヒーレントな光源を照射した際に、内在性分子が入射光子に対して、非線形な応答を示すことは以前から知られており、コラーゲンやミオシン、脂質などの配向分子による第二高調波発生 (SHG)、第三高調波発生 (THG) や蛍光蛋白質の多光子励起による蛍光発生を利用した分子イメージング手法が開発されている。近年の技術革新により、広帯域に渡って安定、高出力である近赤外超短パルスレーザーや超高感度光検出器が登場し、生体内の非線形光学現象を容易に観測できるようになった。近赤外光励起による非線形光学イメージングでは、組織へのダメージが少なく、深部到達性に優れている。また、シグナルは可視光領域に現れるため励起光との分離が容易で、既存の検出器で高感度測定が可能である。多光子蛍光イメージングは、基礎医学研究において強力な解析ツールの一つであり、蛍光プローブの開発研究も進んでいる。一方で、蛍光標識が困難な生体分子の解析や、臨床診断などヒトへの応用に関してはラマン分光法などを利用した、無染色イメージングの技術開発が必要不可欠である。

本研究では、医療応用を目指して外在性のプローブを用いずに目的の生体分子を可視化するという観点から、内在性の生体分子による高調波発生 (SHG, THG)、自家蛍光およびラマン散乱に着目した。ハイパーラマン散乱は、線形ラマン散乱と比較してレイリー散乱光や自家蛍光による妨害を受けにくい。また、選択律に関しても有利で、赤外吸収活性な化学種はすべてハイパーラマン活性であり、赤外・ラマン不活性でハイパーラマン活性な振動モードも存在することが知られている。しかしながら、内在性の生体分子による非線形光学効果の報告例は少ないため、ハイパーラマン散乱、SHG や THG、多光子励起自家蛍光を含めた非線形光学現象の網羅的解析とデータベース構築が必要である。また、基礎研究で得られている知見を臨床診断へ応用するためには、蛍光プローブを用いた従来のイメージングと組み合わせた相補的な解析が必要である。

### 2. 研究の目的

医学・生物学分野において幅広く応用可能な無染色イメージングを実現するため、生体に無害な新規近赤外光源を用いて、光と分子の相互作用から生ずるラマン散乱、高調波発生および多光子励起自家蛍光などの生体分子の非線形光学過程を網羅的に測定・解析する。細胞周期、アポトーシスおよびがん化などの指標となる内在性の生体分子からのシグナルのみを効率よく検出するシステムを構築し、生細胞や実験小動物を用いた *in vivo* 測定による評価を行い、無染色のライブイメージング手法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 自発ラマン・ハイパーラマンスペクトルを測定するための高感度イメージング分光システムの装置製作を行った。本システムは、超高感度 EM-CCD 検出器および透過型 VPH グレーティングを搭載し、自発ラマン散乱のような極めて微弱な信号を検出するのに十分なスループット性と波長分解能を確保するように設計した。

(2) 生細胞や組織を用いた評価に先立ち、532 nm の CW レーザーを光源とした、電子制御波長可変チタンサファイアレーザーを導入し、生体関連分子のラマン散乱スペクトルを計測することによって、システムの評価を行った。また、スペクトルとイメージを同時に取得できるようにするため、電動ステージを搭載した。

(3) ラマン分光システムの医療応用を見据えて、疾患モデルとして卵巣摘出による骨粗鬆症モデルラットの骨基質のラマン分光分析を行った。パラフィン包埋組織切片の顕微鏡ラマンスペクトル解析を行い、病理組織学的解析および生化学的解析の結果との比較を行った。また、既存の多光子励起顕微鏡による *in vivo* イメージングの評価実験系を確立するため、脊髄損傷モデルマウスを導入し、生きている個体の脊髄損傷の病態解析を同一個体にて行った。

(4) 無染色イメージングの診断技術への応用を見据えて、多光子励起顕微鏡システムを用いた生体試料の定量的解析を行った。関節疾患モデルマウスを用いて、関節軟骨のコラーゲン基質より発生する SHG シグナルを利用したイメージング解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 高感度イメージング分光システムの装置製作に関しては、450 ~ 900 nm の波長領域で平均 0.87 nm の波長分解能を有し、80 ~ 90% の透過率を実現した。また、既存の顕微鏡システムとの融合に関しては、まず広視野蛍光顕微鏡に高感度イメージング分光システムを取り付けることによって、倒立顕微鏡ステージ上で試料のラマン散乱スペクトル、蛍光スペクトルおよびイメージングの測定が可能となった。

(2) 電動ステージを搭載することによって、スペクトルとイメージを同時に取得する「ハイパースペクトラルイメージング」も可能となった。将来的には、生体試料の網羅的解析によって励起波長などの具体的な仕様を計測ターゲットごとに決定していくことで、多光子蛍光顕微鏡による非線形光学イメージングとラマン分光分析の組み合わせによる解析プロセスの効率化やさまざまな相乗効果が期待される。

(3) 骨粗鬆症モデルラットの骨基質のラマンスペクトル解析の結果、正常ラットの骨基質との比較において、コラーゲンを主とする骨基質中の有機質成分に有意な変化があることが明らかになった。これらに関連するラマ

ンピークが、骨粗鬆症に起因する骨基質の脆弱性や骨折リスク評価の新しい指標となることが期待される。

(4)関節軟骨の SHG イメージングによって、軟骨基質におけるコラーゲンの分布や形態を可視化することに成功した。さらに、定量的解析法を適用することによって、従来の病理組織学的な特徴をもとに分類した関節疾患の病態や組織編成の程度を数値的に表現できる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Shigehiro Koga, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Koichi Sato, Motohira Yoshida, Yuji Yamamoto, Tadahiro Iimura, Yuji Watanabe, Takeshi Imamura, "In vivo detection of cancer cells with immunoconjugated fluorescent probes by macro zoom microscopy and two-photon microscopy," SPIE Proceedings Vol. 9339 (2015)

doi:10.1117/12.2079092 査読有

Yusuke Oshima, Tadahiro Iimura, Takashi Saitou, Takeshi Imamura, "Changes in chemical composition of bone matrix in ovariectomized (OVX) rats detected by Raman spectroscopy and multivariate analysis," SPIE Proceedings Vol. 9303 (2015)

doi: 10.1117/12.2078787 査読有

Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Takashi Saitou, Tsuyoshi Miyazaki, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, Tadahiro Iimura, Takeshi Imamura, "Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application," Biomedical Optics Express, 6(2), 405-420 (2015)

doi:10.1364/BOE.6.000405 査読有

Yusuke Oshima\*, Takeshi Imamura, Atsuko Shintani, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Terumasa Hibi, Takeharu Nagai, Shigenori Nonaka, Tomomi Nemoto\*, "Ultrasensitive imaging of Ca<sup>2+</sup> dynamics in pancreatic acinar cells of yellow cameleon-nano transgenic mice", International Journal of Molecular Sciences, 15(11), 19971-86 (2014)

doi:10.3390/ijms151119971 査読有

Atsushi Maruyama, Yusuke Oshima\*, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Shigenori Nonaka, Takeshi Imamura, and Kiyoshi Naruse, "Wide field intravital imaging by two-photon excitation digital-scanned light-sheet

microscopy (2p-DSLM) with a high-pulse energy laser," Biomedical Optics Express, 5(10), 3311-25 (2014)

doi: 10.1364/BOE.5.003311 査読有

Shigehiro Koga, Yusuke Oshima, Naoki Honkura, Tadahiro Iimura, Kenji Kameda, Koichi Sato, Motohira Yoshida, Yuji Yamamoto, Yuji Watanabe, Atsuhiko Hikita, and Takeshi Imamura, "In vivo subcellular imaging of tumors in mouse models using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody in TPEM," Cancer Science, 105(10), 1299-306 (2014)

doi: 10.1111/cas.12500 査読有

Yusuke Oshima, Hideki Horiuchi, Naoki Honkura, Atsuhiko Hikita, Tadanori Ogata, Hiromasa Miura, and Takeshi Imamura, "Intravital multiphoton fluorescence imaging and optical manipulation of spinal cord in mice, using a compact fiber laser system," Lasers in Surgery and Medicine, 46(7), 563-572 (2014)

DOI 10.1002/lsm.22266 査読有

Oshima Y, Horiuchi H, Ogata T, Hikita A, Miura H, Imamura T, "In vivo imaging of spinal cord in contusion injury model mice by multiphoton microscopy." SPIE Proceedings (2014) Vol. 8947

DOI: 10.1117/12.2041042 査読有

Yusuke Oshima, Hidetoshi Sato, Hiroko Kajiura-Kobayashi, Tetsuaki Kimura, Kiyoshi Naruse, and Shigenori Nonaka, "Light sheet-excited spontaneous Raman imaging of a living fish by optical sectioning in a wide field Raman microscope," Optics Express 20 (15): 16195-204, (2012)

10.1364/OE.20.016195 査読有

[学会発表](計28件)

Shigehiro Koga, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Koichi Sato, Motohira Yoshida, Yuji Yamamoto, Tadahiro Iimura, Yuji Watanabe, Takeshi Imamura, "In vivo detection of cancer cells with immunoconjugated fluorescent probes by macro zoom microscopy and two-photon microscopy" Photonics West 2015 (BiOS2015), Paper 9339-17, San Francisco USA, 9 February 2015

Yusuke Oshima, Tadahiro Iimura, Takashi Saitou, Takeshi Imamura, "Changes in chemical composition of bone matrix in ovariectomized (OVX) rats detected by Raman spectroscopy and multivariate analysis," Photonics West 2015 (BiOS2015), Paper 9303-601, San Francisco USA, 7 (7-12)

February 2015

Yusuke Oshima, Atsushi Maruyama, Shigenori Nonaka, Takeshi Imamura, Kiyoshi Naruse, "Development of wide-field of view 2p-excited light-sheet microscopy", International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities, Kyoto International Conference Center, 26-28 January 2015

Yusuke Oshima, "Changes in chemical composition of bone matrix in osteoporosis detected by Raman spectroscopy and multivariate analysis," 1st Raman Bio-sensing Seminar 20 Jan 2015, Kwansai Gakuin Kaikan

大嶋佑介、飯村忠浩、齋藤卓、今村健志、「ラマン分光法による骨粗鬆症ラット骨基質の分子計測」第35回レーザー学会学術講演会、東海大学高輪校舎、2015年1月12日(11-12)

大嶋佑介、飯村忠浩、齋藤卓、今村健志、「ラマン分光法および多変量解析による骨粗鬆症ラットの骨基質の解析」第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014年11月25日

大嶋佑介、飯村忠浩、疋田温彦、今村健志、「ラマン分光・イメージング技術の開発と骨代謝研究への応用」第32回日本骨代謝学会学術集会 2014年7月25日(24~26) 大阪国際会議場

Yusuke Oshima, Tadahiro Imura, Atsuhiko Hikita, Takeshi Imamura, "Probe-less molecular imaging for bone metabolism in vivo and in vitro analysis using Raman spectroscopy," The 37th Naito Conference Hilton, Niseko Village, Hokkaido, Japan July 15-18, 2014

大嶋佑介、飯村忠浩、疋田温彦、今村健志「ラマン分光分析を基盤とした骨質計測技術の開発」第34回日本骨形態計測学会シンポジウム 2014年6月13日(12-14) さっぽろ芸文館

大嶋佑介、「ラマン分光法を用いた骨代謝・骨形態計測」第4回バイオラマン研究会、最先端光計測とライフサイエンスの近未来 - バイオ・ラマン2017 - 2014年5月2日 東北大学片平キャンパス片平さくらホール

Yusuke Oshima, Tadahiro Imura, Atsuhiko Hikita, Takeshi Imamura, "Raman spectroscopic study for osteoporosis in ovariectomized (OVX) rats," Biomedical Imaging and Sensing Conference '14(BISC '14), Yokohama, Japan (Oral) (2014/04/23 22-24)

大嶋佑介「種々のバイオイメージング技術の構築について」第11回医用分光学研究会「診断画像構築と増感治療開発の基礎技術としての医用分光」三国観光ホテル 2013年12月7日(福井県)

Yusuke Oshima, Takashi Katagiri, Yuji Matsuura, Atsuhiko Hikita and Takeshi Imamura, "Development of nonlinear optical imaging technique for medical applications by the new optical devices," 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ 異分野連携が拓く新規光学デバイスを駆使したバイオイメージングと医療応用への展開」ポートピアホテル 2013年12月5日(兵庫県)

Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, and Takeshi Imamura, "Evaluation of osteoarthritis based on second harmonic generation microscopy," ASBMR 2013 Annual Meeting, 10/07/2013, Baltimore Convention Center, Baltimore MD, USA

Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, and Takeshi Imamura, "Real time monitoring for differentiation of primary osteoblast culture by using Raman microscopy," ASBMR 2013 Annual Meeting, 10/06/2013, Baltimore Convention Center, Baltimore MD, USA

大嶋佑介、疋田温彦、今村健志「ラマン分光法を用いたがん細胞の無染色イメージング技術の開発」第86回日本生化学会大会 シンポジウム「がんと免疫の蛍光イメージング最前線」2S17p-5, パシフィコ横浜 2013年9月12日(神奈川県)

大嶋佑介、飯村忠浩、疋田温彦、今村健志「医療応用をめざしたラマン分光イメージングシステムの開発」理研シンポジウム 第3回バイオラマン研究会、最先端光計測とライフサイエンスの近未来 - バイオ・ラマン2017 - 愛媛大学医学部重信キャンパス(2013年8月8日)

大嶋佑介、本蔵直樹、疋田温彦、今村健志「In vivo イメージングのための非線形光学顕微鏡の開発と医療応用」第39回レーザー顕微鏡研究会講演会 シンポジウム「新規光源を用いた顕微鏡」2013年7月31日 理化学研究所 和光本所(埼玉県)

大嶋佑介、疋田温彦、今村健志「ラマン分光法・非線形光学イメージングによる骨基質の分子計測」第33回日本骨形態計測学会 2013年7月5日 アクトシティ浜松(静岡県)

Yusuke Oshima, Hideki Horiuchi, Tadanori Ogata, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, and Takeshi Imamura, "In Vivo Imaging and Tissue Ablation for Spinal Cord Injury Model Mice Using

- Multiphoton Microscopy System with 1045 nm Femtosecond Fiber Laser,” Conference on Laser Surgery and Medicine 2013 (CLSM 2013), April 25th, 2013 Yokohama JAPAN
- 21 Hiroshi Kiyomatsu, Yusuke Oshima, Atsuhiko Hikita, Hiromasa Miura, and Takeshi Imamura, “Evaluation of Articular Cartilage Degeneration in Mice Based on Second Harmonic Generation Microscopy,” Conference on Laser Surgery and Medicine 2013 (CLSM 2013), April 24-25th, 2013Yokohama JAPAN
- 22 市原大輔, 大嶋佑介, 大沼清, 佐藤英俊「ラマン分光法を用いた培養生細胞の無標識・無侵襲分析」レーザー学会学術講演会第 33 回年次大会 姫路商工会議所 (2013 年 1 月 28-30 日)
- 23 金ミンス, 今村健志, 大嶋佑介, 橋下剛佑, 佐藤英俊「ラマン分光法による骨芽細胞分化のモニタリング」レーザー学会学術講演会第 33 回年次大会 姫路商工会議所 (2013 年 1 月 28-30 日)
- 24 大嶋佑介, 「生細胞のラマン分光分析技術の開発と医療応用」日本分光学会 生細胞分光部会シンポジウム 2013 年 1 月 25 日 北海道大学電子研 (北海道)
- 25 Yusuke Oshima, Naoki Honkura, Atsuhiko Hikita and Takeshi Imamura, “Development of probe-less imaging techniques for translational research,” 第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ 生体分子イメージングへの新たな挑戦～ラマン分光、プローブレスイメージングによる分子機能解析とがん診断への応用～ 福岡 2012 年 12 月 12 日
- 26 大嶋佑介, 堀内秀樹, 本蔵直樹, 疋田温彦, 尾形直則, 三浦裕正, 今村健志, 「マウス脊損モデルにおけるフェムト秒ファイバーレーザーを用いたアブレーションと非線形光学を駆使したインビボイメージング」第 33 回日本レーザー医学会総会 2012 年 11 月 11 日 大阪大学
- 27 大嶋佑介, 疋田温彦, 今村健志「ハイスループットラマン分光イメージングシステムを用いた生体組織の網羅的解析」理化学研究所 第 2 回バイオリマン研究会, 最先端光計測とライフサイエンスの近未来 - バイオ・ラマン 2017 - 理化学研究所和光キャンパス (2012 年 10 月 26 日)
- 28 大嶋佑介, 今村健志「生体の無染色イメージング技術開発と医学応用」秋季第 73 回応用物理学会学術講演会 (一般, ポスター) 2012 年 9 月 13 日, 愛媛大学 (愛媛県)

〔図書〕(計 8 件)

- 今村健志, 大嶋佑介, 疋田温彦, 古賀繁宏「非線形光学を駆使した生体蛍光イメージング」医学のあゆみ Vol. 251 No.11 p.1069-1074 2014.12.13
- 大嶋佑介「一枚の写真 生体深部を高速かつ広い視野で観察できる光シート顕微鏡」OplusE アドコムメディア株式会社, 422 号, 2014, 1-2 ページ
- 今村健志, 疋田温彦, 大嶋佑介, 飯村忠浩「バイオイメージングの現状と展望」株式会社インナービジョン 39-41 ページ, 7 月号 MI 特集 (2014)
- 大嶋佑介, 飯村忠浩, 疋田温彦, 今村健志「ラマン分光法による骨組織の分子計測と骨質評価への応用」The Bone 小誌第 125 号 91-96 ページ(2014 年 4 月号)「骨バイオイメージング」
- 今村健志, 疋田温彦, 大嶋佑介「In vivo imaging の最前線」整形・災害外科 56:755-759, 2013 (Vol. 56 No. 6 2013) 金原出版株式会社
- 今村健志, 疋田温彦, 大嶋佑介, 飯村忠浩「骨・軟骨組織の生体光イメージング」月刊誌 CLINICAL CALCIUM 医薬ジャーナル社, Vol. 23 No. 12, 1767-1773 ページ (2013)
- 大嶋佑介「無染色イメージングの技術開発と医療応用 = 細胞のラマン分光から生体の非線形光学イメージングへの技術展開 = 」光アライアンス Vol.24 No.4 日本工業出版 6-9 ページ (2013)
- 野中茂紀, 大嶋佑介「短時間での広視野ラマンイメージングが可能に」OplusE アドコムメディア株式会社, 396 号, 2012, 996 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 観察用具及び観察装置  
 発明者: 大嶋佑介, 根本知己, 鈴木智  
 権利者: 愛媛大学, (株)イントロテック  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2013-040111  
 出願年月日: 2013 年 2 月 28 日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 佑介 (Oshima, Yusuke)  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号: 10586639