

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560411

研究課題名(和文) 組織内環境の多光子励起イメージングによる新奇検査・診断法の開発

研究課題名(英文) Development of novel fluorescent dye for multiphoton imaging of deep region of animal tissue

研究代表者

日比 輝正(Hibi, Terumasa)

北海道大学・電子科学研究所・特任講師

研究者番号：50554292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は生体組織の構造を深部まで可視化する蛍光色素の開発を目的とした。そこで蛍光分子の蛍光波長が周囲の環境に応じて変化する「ソルバトクロミズム」を利用した。本研究では、組織深部を可視化する技術の改良と新奇蛍光色素の探索及び設計に取り組んだ。イメージング技術の改良では、(1) 組織の簡便な透明化法の確立、(2) 透過型液晶素子による収差補正装置の開発、(3) 多点走査高速多光子顕微鏡法の改良、(4) 麻酔下マウス皮膚の非侵襲観察法の確立を実施した。最終的に、新たに開発した蛍光色素をマウス皮内に投与し、麻酔下マウスの皮膚構造を3次元的に可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is development of novel fluorescent dye which visualizes structure of tissue even at deep region. We took the advantage of "solvatochromism", the ability to change color depending on the environment of the dye. In this study, we improved imaging techniques to observe deeper region of tissue in animals and explore and design novel fluorescent dyes. Regarding improvement of imaging techniques, (1) establishment of simple clearing protocol for tissue observation, (2) development of transmissive liquid crystal devices correcting optical aberrations, (3) improvement of high-speed multiphoton microscopy using a multipoint-scanning method, and (4) establishment of non-invasive skin imaging in an anesthetized living mouse were carried out. Finally, by intradermal injection of novel developed fluorescent dyes, it was succeeded to visualize three-dimensional structure of skin in a living mouse.

研究分野：バイオイメージング

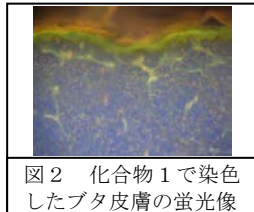
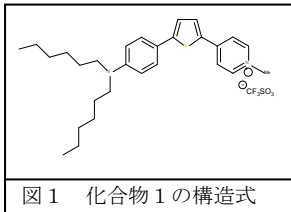
キーワード：組織染色 蛍光色素 ソルバトクロミズム 多光子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) レーザー顕微鏡は、医学・生物学の基礎研究に必須の技術となっている。先端的レーザー顕微鏡技術である多光子顕微鏡は、生体へのダメージが少なく、透過性が高いことから、生きた個体の深部を観察可能な技術として注目を集めている。当研究室は、多光子顕微鏡による組織深部観察の高い技術を有し、研究開始当初において、麻酔下のマウス脳の大脳皮質全域から海馬CA1領域にかけての可視化にも成功していた (Kawakami R *et al.*, Sci. Rep. 2013)。このように多光子顕微鏡を用いることで生体深部の観察が可能となるが、血中への蛍光色素の投与などの一部の例を除いて、その多くが蛍光タンパク質を発現する遺伝子組換え動物による基礎研究の結果であった。蛍光タンパク質の利用は基礎研究では非常に有用であるが、ヒトの組織を用いた研究や臨床応用においては、倫理面などから困難である。そこで私は、組織深部の構造を外部から染色可能な蛍光物質を開発することにより、多光子顕微鏡を検査・診断にも応用するための道を拓くことができると考えた。

(2) 生物学研究によく用いられる蛍光物質の一部は、注射などにより組織深部に注入することは可能であるが、蛍光色素の単なる拡散だけでは、組織内の構造を反映した染色とはならない。一方、特定のオルガネラに局在する色素や免疫染色のような特異的染色では、組織構造全体を描き出すことはできない。組織内の様々な微細構造を蛍光物質によって描出するためには、組織毎の様々な状態を区別可能な染色方法が必要となる。

(3) 「ソルバトクロミズム」は、分子周囲の環境に応じて分子内のエネルギー状態が変化し、放出される蛍光波長が変化する現象である。ソルバトクロミズムを呈する蛍光色素により組織深部を染色できれば、組織の環境を反映して蛍光波長が変化する事が期待され、組織の構造を捉えられる可能性がある。我々は、この考えに基づき、予備的検討として図1の蛍光有機化合物による組織染色について検討した。ブタ皮膚断面をこの物質によって染色した所、部位特異的な蛍光の放出が確認された (図2)。



(4) 実用的に組織の深部観察に蛍光色素を用いる際には、もっとも大きな問題となるのは、蛍光色素の組織浸透性である。蛍光を発するためには、有機化合物の構造中の π 電子共役系の広がりが必要であるため、蛍光分子はかさ高い分子となっていることが多く、そのために組織浸透性が悪い。しかしながら、

図1に示した蛍光分子は、全体としてはかさ高くなっているものの、発色団のみの構造は、多くの市販の蛍光分子に比べると比較的コンパクトな構造となっている。加えて、分子全体としては両親媒性の構造を有するので、組織外液や緩衝液への溶解性を保ちながら、組織浸透性を高めることが可能であると期待された。

2. 研究の目的

(1) 上述の特長から、化合物1の発色団の構造を基本構造にして側鎖を変化させることで、組織浸透性の高い実用的な染色試薬となり得ると考えられた。そこで本研究では、組織構造に応じて蛍光波長が変化する化合物1を基本に、組織染色性が高く実用に足る新奇蛍光色素の開発を目指すこととした。

(2) また、目的となる蛍光色素の候補を評価・選定する際、そのような化合物により組織の深部までを染色できたとしても、評価するためには、組織の深部を明瞭にイメージングする技術が必要となる。そこで、本研究においては、組織深部のイメージング技術についても並行して改良を進め、蛍光物質を外部から導入しての組織深部の観察における問題点を、観察技術の面からも克服することも含めて研究を行なった。

(3) イメージング技術の改良としては、①組織の持つ複雑な屈折率からの影響を低減するための手法、②生体観察時の体動の影響を最小限にするために必要となる高速な画像取得法、③生体の皮膚内部を3次元的に安定的にイメージングするための方法、の3つについて検討を行なった。

3. 研究の方法

(1) 組織深部のイメージング技術開発に関する方法について、以下に示す。

① 組織の持つ複雑な屈折率から影響を低減するための手法として、透徹処理と収差補正の2つのアプローチで行なった。透徹処理には、2,2'-thiodiethanol (TDE) を利用した。収差補正には透過型位相変調液晶素子を用いた。球面収差、コマ収差 (0度、90度)、非点収差 (0度、45度) の計5成分について、各々の成分に相当する波面を形成できる液晶素子を作製した。これらの素子を多光子顕微鏡の対物レンズ直前に取り付け、屈折率を調整したアガロースに蛍光ビーズを包埋した試料を評価に用いた。

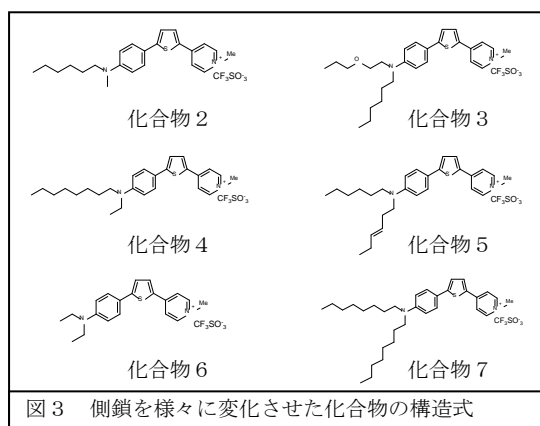
② 生体観察時の体動の影響を最小限にするために必要となる高速な画像取得法としては、スピニングディスクによる多点走査方式の多光子顕微鏡法を用いた。励起光には、Ybベースレーザーである femtoTRAIN (スペクトラ・フィジックス社) を用いた。多点走査を実現するためには横河電機社の CSU-X1 をベースとして、内部のスピニングディスクを改良した物に交換して用いた。顕微鏡筐体はオリンパス社 IX-71 を使い、対物ピエゾ駆動

装置としてピー・アイ社製 P-721 を、蛍光の検出にはアンドール社の Neo または iXon-Ultra を用いた。

③ 生体皮膚観察時には、マウスをペントバルビタール（腹腔投与）またはイソフルラン（吸入投与）により麻酔した。麻酔下のマウス皮膚をガラスボトムディッシュに押し当てながらリング状のマグネットと厚紙で挟み、顕微鏡ステージに固定することにより安定に保持し、多光子顕微鏡にて観察した。

(2) 蛍光色素の開発と評価については、以下の方法により実施した。

① ソルバトクロミズムを有する化合物 1 の側鎖を変化させた 6 種の化合物について、組織染色時の特性を調べた。用いた化合物は図 3 に示した。検討にはスペクトルディテクターを装備した多光子顕微鏡を用い、試料にはブタ皮膚を使用した。



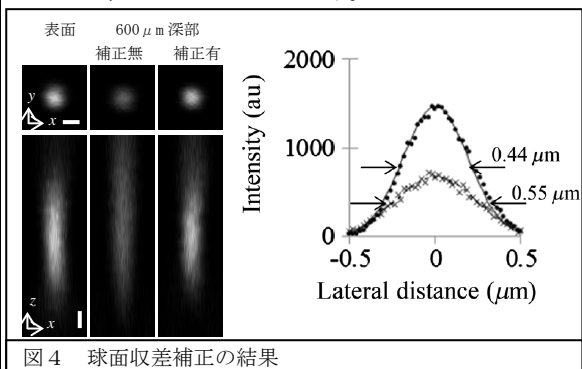
② 検討結果を踏まえて、新たな候補化合物を設計・合成した。候補化合物については多光子顕微鏡を用いた生体皮膚観察法により評価を行なった。蛍光物質の投与は皮内注射によって行ない、麻酔下マウスの皮膚組織内を多光子顕微鏡の対物レンズ下で保持して、皮膚表面から直接観察を行なった。

4. 研究成果

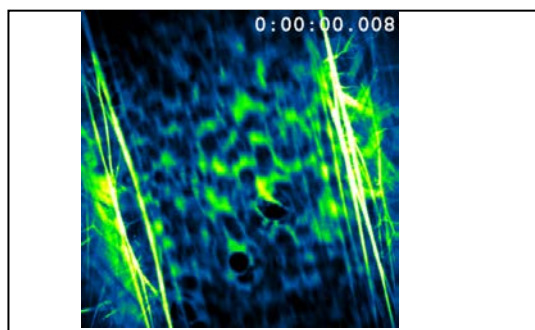
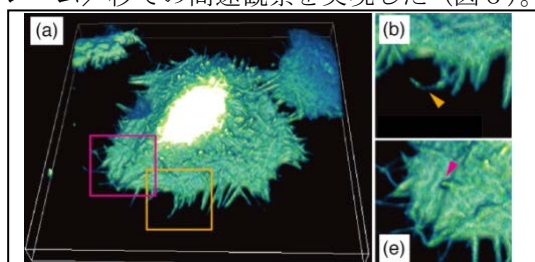
(1) 組織のイメージングにおいては、組織の持つ複雑な屈折率によって集光が乱れる。この解決方法の一つとして、浸透性が高く組織構造や蛍光物質に影響を与えない溶媒に浸漬する透徹化処理がある。我々のグループは、透徹剤として TDE を用いることで、摘出した組織の散乱を抑え、組織深部を明瞭に観察する方法を確立した。この方法を多光子顕微鏡を組み合わせ、摘出固定脳を 3 次元構造を保ったままでの観察に成功した (Aoyagi Y *et al.*, PLoS ONE 2015)。

(2) 組織深部の観察では、対物レンズ浸液の屈折率と組織内部の屈折率差から様々な収差が生じて集光が劣化し、明るさや分解能の低下を招く。本研究では、透過型位相変調液晶素子を利用した収差補正素子を開発し、多光子顕微鏡の対物レンズ直前に挿入して、球面収差の補正に成功した (Tanabe A *et al.*, Proc. SPIE 2015, Tanabe A *et al.*, J. Biomed.

Opt. 2015)。例として、蛍光ビーズ測定では、屈折率 1.42 の媒質中、深さ $600\ \mu\text{m}$ の深さにおける球面収差を補正し、ほぼ表面近傍と同様のビーズ像が得られた (図 4)。また、摘出組織の観察においてもこれを適用し、収差の補正に成功した。更に、同様に透過型位相変調液晶素子を用いて非対称収差の補正装置も開発し、補正効果を確認した (Tanabe A *et al.*, Proc. SPIE 2016)。



(3) 3 次元的な生体観察では、焦点面をずらしながら多数の光学断層像を取得する必要があるため、より高速なイメージング法が求められる。本研究では、高速に光学断層像の取得が可能な、スピニングディスク式多点走査型多光子顕微鏡の改良にも取り組んだ。高出力かつ低繰り返し周波数の Yb ベースレーザーを導入することにより、ビーム径を拡大しても十分な輝度の確保が可能になり、視野の拡大に成功した (図 5、Otomo K *et al.*, Anal. Sci. 2015)。更にこの高速多光子顕微鏡を麻酔下マウス皮膚内の観察に用いた。蛍光色素を血中に投与しての観察では、100 フレーム/秒での高速観察を実現した (図 6)。



(4) 本研究では、生体皮膚を表面から非侵襲

で3次元的に観察する手法の開発も行なった。まず ROSA26H2BEGFP マウスと体毛の無い HR1/Hos マウスを交配することにより「H2BEGFP ヘアレスマウス」を樹立した。更に観察時の体動を軽減するための保定方法として、リング状のマグネットと厚紙を用いた方法を確立した。麻酔下の H2BEGFP ヘアレスマウスに、確立した保定方法を適用して多光子顕微鏡で観察を行なうことにより、様々な部位の皮膚の3次元ライブイメージングを可能にした(図7)。この方法を用いた観察により、表皮基底細胞の細胞分裂の様子を3次元的に捉えることに成功し、その分裂方向を解析したところ、斜め方向の分裂の割合と表皮の厚さに相関があることが明らかとなった。

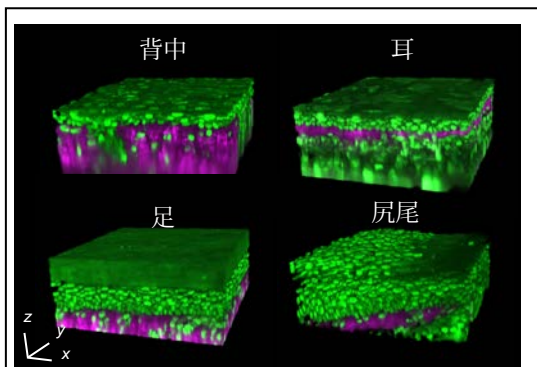


図7 麻酔下の H2BEGFP ヘアレスマウスの、様々な部位の皮膚の3次元ライブイメージング。

(5) 組織を染色する蛍光物質を検討するために、まず化合物1を用いたブタ皮膚の染色を行ない、組織構造毎の蛍光スペクトル変化について、スペクトルディテクターを備えたレーザー顕微鏡を用いて詳細な解析を実施した。その結果、組織の部位に応じた蛍光波長特性の変化の詳細が明らかとなり、疎水性の角質層は長波長蛍光を、親水性の細胞内部は短波長蛍光を発していた(図8)。この結果は、組織構造の疎水性と親水性の分子環境の違いを反映したスペクトル変化を示していると考えられ、この蛍光物質と分光イメージングの組み合わせによって、表皮の中の分子環境を反映した組織構造の描出が可能であることが確かめられた。

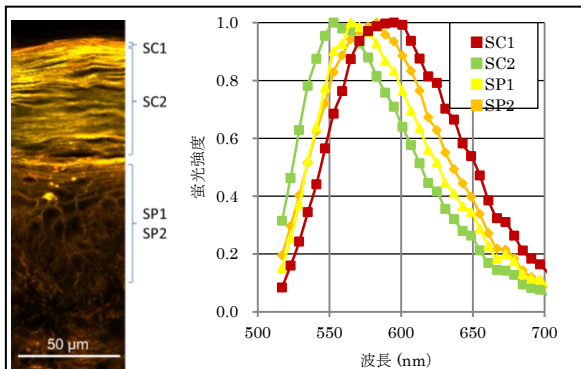


図8 化合物1によるブタ皮膚染色像と各領域の蛍光スペクトル

(6) また、多光子顕微鏡での利用可能性について、化合物1を用いて染色したブタ皮膚を用いて確認した。その結果、励起波長 960 nm によって2光子励起蛍光を取得することが可能であり、皮膚の組織構造を捉えることに成功した。この際、細胞の核は染色されていなかったが、蛍光核染色試薬である Hoechst 33342 と併用することによって、細胞核の構造も描出することも可能であった(図9)。組織染色の方法として病理標本の評価などで標準的に用いられている方法にヘマトキシリン-エオシン(HE)染色が挙げられるが、細胞の核と組織の構造の両方を描出できるこの方法は、これまでの HE 染色による組織形態の評価との比較の上でも重要であると考えられる。

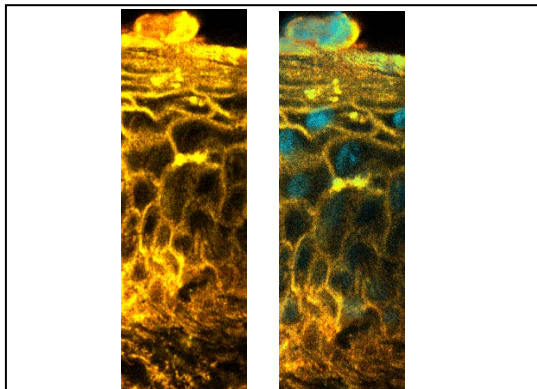
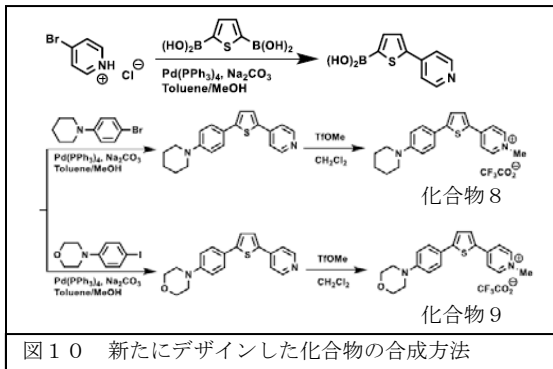


図9 化合物1でのブタ皮膚の多光子顕微鏡像(左)とHoechst33342による蛍光像との重ね合わせ(右)。

(7) 次に、発色団の基本構造の側鎖を変化させ、特に側鎖のかさ高さが、波長特性、輝度、組織浸透性等に与える影響について検討した。側鎖を様々に変えた化合物2~7を用い、側鎖の違いが蛍光スペクトル等に与える影響を検証したところ、いずれの化合物を用いた場合においても皮膚構造を描出できた。スペクトルディテクターにより表皮の構造と蛍光スペクトルのピーク波長の関係を調べたところ、側鎖の構造はほぼ影響せず、組織の染色パターンにも大きく影響を与えていなかった。一方で、側鎖がかさ高くなると、染色の際に用いる溶媒への溶解性が悪くなる傾向がみられた。また、今回の実験条件の中では、化合物1~7は組織浸透性が殆どなかった。従って、組織内の3次元イメージングに適用するためには、組織浸透性を高くするように構造を改良する必要があった。以上から、側鎖部分の構造変更により、組織構造に依存して波長が変化するという特性を損なうことなく、分子全体のかさ高さを抑えることが可能であり、組織浸透性を高められる可能性が示唆された。

(8) 組織浸透性を高めるため、化合物1の側鎖部分をコンパクト化することが必要と考え、化合物8および9を候補化合物としてデザインし、合成方法についての検討を行なった(図10)。



(9) 化合物 8、9 をマウス皮膚の生体イメージングに適用した。これら化合物を H2BEGFP ヘアレスマウスに皮内注射し、正立型多光子顕微鏡を用いて麻酔下での直接観察を行った。化合物 8 は 900 nm 程度の励起波長を用いることで 2 光子励起することができ、580 nm 付近をピークとする蛍光スペクトルで、表皮基底細胞の形質膜が染色されていた。更に、タイムラプス観察を行なうことにより、表皮基底細胞が細胞分裂する様子を明瞭に可視化することにも成功した (図 1 2)。化合物 8 による染色では、形質膜以外の部分は殆ど蛍光を発していないようであり、また表皮顆粒層のタイトジャンクションを越えていないようであった。一方、化合物 9 の場合には、化合物 8 とは異なり、形質膜だけでなく細胞内も粒状に染色されており、またタイトジャンクションを越えて表層付近の細胞も染色されていた (図 1 3)。化合物 9 においては、形質膜の蛍光のピークはおおよそ 580 nm 付近であり、細胞内の蛍光のピークはおおよそ 600 nm と、部位に応じて蛍光波長の特性が異なっていた。以上のように、本研究では、多光子顕微鏡による 3 次元的な組織構造を描出する化合物の開発に成功した。

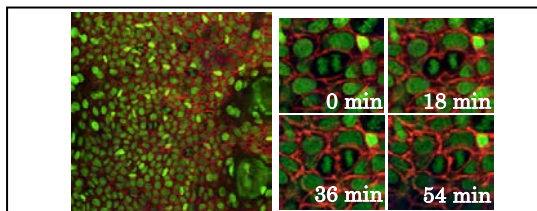


図 1 1 化合物 8 による麻酔下 H2BEGFP ヘアレスマウス表皮の 3 次元タイムラプス観察の結果。右は細胞分裂を捉えた画像。

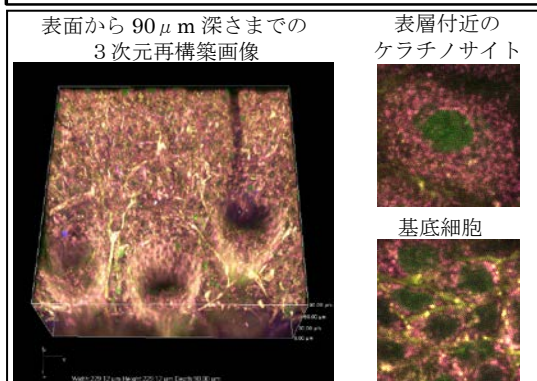


図 1 2 化合物 9 による麻酔下 H2BEGFP マウス皮膚の観察像。

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 18 件)

① Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto

Correcting spherical aberrations in biospecimen using transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy
Journal of Biomedical Optics, 20, 101204-1 - 101204-11 (2015)

DOI: 10.1117/12.2209459

査読有

② Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Takashi Murata, Hirotaka Watanabe, Ryosuke Kawakami, Hiroshi Nakayama, Mitsuyasu Hasebe, Tomomi Nemoto

Multi-point scanning two-photon excitation microscopy utilising a high-peak-power 1042-nm laser
Analytical Sciences, 31, 307-313 (2015)

DOI: 10.2116/analsci.31.307

査読有

③ Yuka Aoyagi, Ryosuke Kawakami, Hisayuki Osanai, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto

A Rapid Optical Clearing Protocol using 2,2-Thiodiethanol for Microscopic Observation of Fixed Mouse Brain
PLoS ONE, 10, e0116280 (2015)

DOI: 10.1371/journal.pone.0116280

査読有

[学会発表] (計 46 件)

① Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Hirotaka Watanabe, Yumi Yamanaka, Hiroshi Nakayama, Tomomi Nemoto

High-Temporal Resolution 3D and 4D Bio-Imaging by Two-Photon Excitation Spinning Disk Confocal Microscopy

FOM 2016, Taipei (台湾)

2016 年 3 月 23 日

② Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto

Transmissive liquid-crystal device correcting primary coma aberration and astigmatism in laser scanning microscopy
SPIE BiOS, San Francisco (アメリカ)

2016 年 2 月 7 日

③ Takashi Murata, Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Hiroshi Nakayama, Tomomi Nemoto, Mitsuyasu Hasebe

Perinuclear microtubule clusters initiate a spindle as centrosomes in tobacco cells
ASCB annual meeting, San Diego (アメリカ)

2015 年 12 月 15 日

④村田隆、大友康平、日比輝正、中山博史、根本知己、長谷部光泰
2 光子励起スピニングディスク共焦点顕微鏡による植物紡錘体形成の 3D ライブイメージング
第 67 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀（東京都江戸川区）
2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日
⑤一本嶋佐理、日比輝正、根本知己
In vivo 2 光子イメージングによる表皮基底細胞における 3 次元的な分裂方向の解析
第 67 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀（東京都江戸川区）
2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日
⑥ Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Sari Ipponjima, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto
Transmissive liquid crystal devices correcting the spherical aberrations in laser scanning microscopy
SPIE BiOS, San Francisco (アメリカ)
2015 年 2 月 7 日

〔図書〕(計 3 件)

①根本知己、大友康平、日比輝正、一本嶋佐理
羊土社「実験医学別冊 初めてでもできる！超解像イメージング STED、PALM、STORM、SIM、顕微鏡システムの選定から撮影のコツと撮像例まで」(岡田康志編)
発行年：2016 年
総ページ数：309 ページ
原理・応用編～超解像イメージングの可能性を学ぼう！ 第 1 章 5. 透過型液晶デバイスを用いた共焦点および 2 光子顕微鏡の超解像化 (印刷中)

②根本知己、日比輝正、川上良介
朝倉書店「発光の事典 一基礎からイメージングまで」(木下修一・太田信廣・永井健治・南不二雄 編)
発行年：2015 年
総ページ数：788 ページ
第 7. 3. 2 節 2 光子蛍光イメージング、630-636

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

①
名称：照明装置及び照明光生成方法
発明者：日比輝正、大友康平、根本知己、小澤祐市、田辺綾乃、橋本信幸
権利者：シチズンホールディングス (株)
番号：特願 2016-023924
出願年月日：2016 年 2 月 10 日
国内外の別：国内

②
発明の名称：液晶光学デバイス
発明者：日比輝正、一本嶋佐理、根本知己、田辺綾乃、橋本信幸、栗原誠、松本健志、横山正史
権利者：シチズンホールディングス (株)
番号：特願 2013-262481 (PCT/JP2014/080758)
出願年月日：2013 年 12 月 19 日
国内外の別：国内および国外

③
名称：補償光学素子の設計方法及び顕微鏡
発明者：日比輝正、根本知己、松爲久美子、富岡貞祐、浜田啓作
権利者：(株) ニコン
番号：特願 2013-160985
出願年月日：2013 年 8 月 3 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

(1) ホームページ

①北海道大学電子科学研究所光細胞生理研究分野

<http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/mcb/>

②researchmap

<http://researchmap.jp/thibi/>

(2) アウトリーチ活動について

2013 年 6 月 8 日、2014 年 6 月 7 日、2015 年 6 月 6 日のそれぞれに、北海道大学電子科学研究所の一般公開が行なわれたため、その機会を利用して、来場した一般の方々に、蛍光を利用したバイオイメージング技術についての解説を行ない、試料を実際に蛍光顕微鏡により観察して戴くことも実施した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比輝正 (HIBI, Terumasa)

北海道大学・電子科学研究所・特任講師

研究者番号：5 0 5 5 4 2 9 2