

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26650107

研究課題名(和文) 励起レーザーのベクトルビーム化による高精細3次元蛍光イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of high-resolution three-dimensional fluorescence imaging method using vector beams of excitation laser

研究代表者

川上 良介 (KAWAKAMI, RYOSUKE)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40508818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：始めに固定脳スライスにおいてベクトルビームの効果を脳埋め込み蛍光ビーズ像から評価した結果、直線偏光においても視野において異なる光学特性を示すことが示唆された。次に、新たな透徹剤によって固定脳を透明化した結果、表面から数十 μm の深さにおいては集光が保たれる条件を見出した。そこで超解像顕微鏡(構造化照明顕微鏡)へ応用し、通常では観察不可能であった深部領域において超解像効果が得られ、神経細胞シナプスのスパイン構造をより詳細に現すことに成功した。次に、生体脳における集光特性について解析した結果、そのカバーガラスの傾きや厚さ、浸液の屈折率の調整によって大きく改善することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Evaluation of the effect of vector beam in fixed brain slice implanted fluorescent beads suggests that it shows different optical characteristics and focusing properties even in linearly polarized light. Next, Evaluating the optical properties in the fixed brain with a novel clearing reagent, conditions of that were maintained at a depth of several micrometer from the surface. Therefore, we tried to be applied the methods to super-resolution microscope (structured illumination microscope), the effect was obtained in the deep region and the spine structure of neuronal synapse in more detail which was not normally observable. Next, we tried to analyze the optical properties in the living brain, and found some conditions by adjusting the angle of the cover glass and the refractive index of the immersion liquid.

研究分野：顕微鏡

キーワード：集光特性 固定脳 生体脳 超解像顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

共焦点蛍光顕微鏡法は基礎生物学から医学まで、幅広く利用され、今では蛍光を用いたタンパク質動態やタンパク質発現解析に無くてはならない技術として浸透している。「共焦点効果による光学断面イメージ」が取得できることが重要である。この断層効果は共焦点ピンホールにより焦点以外からの光を遮蔽することによって得られる。一方、2光子顕微鏡法においては励起光の集光スポットのみで蛍光物質が励起されることから、必然的に断層イメージの取得が可能である。イメージングの解像度は励起光レーザーの集光スポットの大きさに依存することが知られており、一般的にはレイリー卿の回折限界の式として著わされている。実際の蛍光顕微鏡法において、解像度は対物レンズのNAと励起波長の長さに依存する。特に、生きたままの生体をそのまま観察する in vivo 2光子顕微鏡法では深部の解像度は犠牲になってしまう。これは、励起レーザーが様々な要因によって理想的な集光が為されていないことが原因と考えられており、特に太い血管の下にある構造については可視化することが出来ないことが知られている。レーザー走査型顕微鏡の励起レーザーは直線偏光を用いている。本申請者はこれまで共同研究の一環として励起レーザーをベクトル化することで生体脳深部においてZ方向の解像度が向上することを見出した。このことは、論理的にレーザーの自己治癒効果によるものである可能性が報告されており、本申請の着眼点はこの自己治癒効果を用いて蛍光顕微鏡法の高度化に結び付くか否かを実証することにある。

2. 研究の目的

本研究は in vivo 2光子顕微鏡法で観察できない「太い血管の裏」を、励起レーザーの位相と偏光を調整したベクトルビームを用いることで、高精細な蛍光イメージングを達成することを目的とする。予備検討により、励起レーザーの偏光を放射相称にベクトルビーム化することで、生体マウス脳深部におけるZ方向の分解能が向上することが示唆されている。そこで、本研究では2光子励起、1光子励起の双方において3次元蛍光像の画質向上を、生体脳深部並びに固定脳を用いて試みる。本提案手法の確立により、これまで無視されがちであった生体蛍光イメージングにおける3次元情報をより詳細に解析することが可能になり、医学生物学分野での広範な応用が期待される。

3. 研究の方法

励起レーザーのベクトル化の効果をマウス生体脳において計測するために蛍光ビーズを生体脳へ注入し in vivo ならびに固定脳スライスにおいて蛍光イメージングを行い、レーザーの集光パターンを評価した。液晶素子

デバイスを顕微鏡光路系へ導入し、励起光のベクトルビーム化の確認を行った。次に、マウス生体脳内へ蛍光ビーズを安定に配置するためにガラス細管を用いて生体脳へ注入した。その後、in vivo 2光子顕微鏡法を用いてマウス大脳皮質実質に分散している蛍光ビーズを3次的にイメージングし、得られた蛍光イメージより半値全幅を計測し XY、XZ の解像度を評価した。次に、蛍光ビーズを注入したマウスをホルマリン固定し、固定脳スライスにおいて可視光による共焦点顕微鏡法での3次元空間解像度を検証した。

生体脳内におけるレーザースポットの評価系の確立

マウス生体脳内におけるレーザーの集光スポットを可視化するために、500nm の蛍光ビーズを微小ガラス管により油圧シリンジポンプを用いて生体脳へ埋め込んだのち、Open Skull 法を用いて観察用窓を作成した。この蛍光ビーズの3Dイメージを取得することで、生体脳内での集光状態を評価した。また、脳構造との関連を評価する為、一部の神経細胞のEYFPを発現するH-Lineマウスを用い、同時イメージングを行った。

4. 研究成果

固定脳ではその散乱の強さや屈折率差による収差のため、表面から数十マイクロメートルの深部ではイメージ像がぼやけてしまう。そこで、固定脳スライスにおいて共焦点顕微鏡法に対するベクトルビームの効果を検証した。対物レンズの直上に1/2分割液晶素子を導入し、1光子励起で使用する4種類の可視光レーザーそれぞれに対し径偏光化を行った。共焦点顕微鏡法での解像度を評価する為に、直径100nm以下の蛍光ビーズを生体脳へ埋め込み、数日後にパラフォルムアルデヒドで脳を固定した。固定脳の大脳皮質領域、海馬領域、白質、扁桃体領域において蛍光ビーズを共焦点顕微鏡(Nikon A1R)で3次元イメージングし、得られた蛍光ビーズ像から焦点形状を評価した。その結果、直線偏光による集光では脳の様々な領域において異なる光学特性を示す可能性が示唆された。次に、単純な人工散乱体を作成し、蛍光ビーズを包埋する実験では、散乱の強さに依存せず集光特性はほぼ変化しないことを明らかになった。一方で、高散乱体中では励起レーザーが到達しないためか、非常に強いレーザー強度が必要であった。その為、100nm以下の蛍光ビーズの場合、特に波長の短い青色で励起しなければならない蛍光物質において、3次元イメージングの際に褪色の影響で正確な焦点形状が得られない問題が発生した。そこで、褪色に強い蛍光物質を用いることを検討した。褪色に強い色素にはQ-Dotやダイヤモンドセンターが知られている。しかしながら、これらを検証した結果、十分な蛍光輝度が得られなかったことから応用を断念した。固定脳においてはその脳領域や部位におい

て異なる集光特性を示すことが明らかになった。これは、脳組織の持つ屈折率差により発生する収差が集光に大きな影響を与えていると考えられた。そこで、屈折率調整可能な透徹剤を新たに調整することによってサンプルを透明化し、さらに収差の低減を試みた。その結果、固定のスライス表面から数十 μm の深さにおいては集光が保たれる条件を見出した。そこで、励起光の集光特性が同様に重要な超解像顕微鏡法である構造化照明顕微鏡 (N-SIM) においてその条件の応用を試みた。その結果、未処理の固定脳スライスでは観察不可能であった固定脳深部領域において超解像効果が得られ、さらに長期ストレスのモデルマウスでもある人工副腎皮質ホルモン長期投与マウスにおいて、その神経細胞シナプスのスパイン構造が微細に変化していたことを見出した。この成果は固定脳内における集光特性についても詳細に検討しており、原著論文として報告した。本研究成果は新たな顕微鏡法としての有意義性が高いと考えている。次に、生体脳における集光特性についての詳細な解析を実施した。その結果、生体脳イメージングにおいてはそのカバーガラスの傾きや厚さ、浸液の屈折率の調整によって大きく改善することが明らかになった。集光特性の向上は焦点における励起光のエネルギー密度の向上を意味する。現在、この調整法を生体脳内における神経回路のピンポイント破壊への応用が可能であることを見出し、論文投稿を準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Kazuaki Sawada, Ryosuke Kawakami, Ryuichi Shigemoto, Tomomi Nemoto
Super-resolution structural analysis of dendritic spines using three-dimensional structured illumination microscopy in cleared mouse brain slices
European Journal of Neuroscience. 2018
doi:10.1111/ejn.13901

(2) Hong Zhang, Ami Masuda, Ryosuke Kawakami, Kenji Yarinome, Riku Saito, Yu Nagase, Tomomi Nemoto, Yosuke Okamura.
Fluoropolymer nanosheet as a wrapping mount for high quality tissue imaging
Advanced Materials, 2017, vol. 29, pp. 1703139-1-1703139-6,
doi: 0.1002/adma.201703139,

(3) Kawakami R, Sawada K, Kusama Y, Fang YC, Kanazawa S, Kozawa Y, Sato S, Yokoyama H, Nemoto T.
In vivo two-photon imaging of mouse hippocampal neurons in dentate gyrus using a light source based on a high-peak power gain-switched laser diode.
Biomedical optics express, 6(3) p891-901,

2015

doi: 10.1364/BOE.6.000891

〔学会発表〕(計6件)

(1) 川上良介, 高橋泰伽, 安宅光倫, 鎗野目健二, 張宏, 岡村陽介, 根本知己
マウス生体脳における広視野2光子イメージングのための open skull 法の改良
レーザー学会 第 510 回研究会「ニューロフォトンクス」2017年10月27日、北海道・札幌市

(2) 川上良介, 根本知己
脳神経科学に向けた in vivo 2光子顕微鏡法の改良
〔招待講演〕レーザー学会 第 498 回研究会「ニューロフォトンクス」2016年11月17日、東京都・小金井市

(3) 川上良介, 澤田和明, 草間裕太, 房宜激, 金沢信哉, 小澤祐市, 佐藤俊一, 横山弘之, 根本知己
高出力 1064 nm 光源によるマウス大脳皮質 - 海馬歯状回の in vivo 2光子イメージング
〔招待講演〕第 93 回日本生理学会大会、2016年3月24日、札幌市

(4) Nemoto T, Kawakami R, Hibi T, Otomo K, Ipponjima S, Sawada K, and Tanabe A
Intravital Light Microscopy Advanced by Novel Laser and Optical Technologies
〔招待講演・国際〕The Fourth Japan-China Symposium on Nanomedicine, 2016年05月12-13日、Kitakyushu International Conference Center、北九州市

(5) 飯島光一郎, 川上良介, 根本知己
機能的コネクトーム解析に向けた生体脳イメージング技術について
〔招待講演〕日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2015、2015年10月28-30日、筑波大学東京キャンパス、東京都文京区

(6) 根本知己, 川上良介, 田辺綾乃, 日比輝正, 大友康平, 橋本信幸
多光子顕微鏡を用いたマウス生体脳の 3D イメージング
〔招待講演〕3次元画像コンファレンス 2015、2015年07月10日、海洋研究開発機構横浜研究所、横浜市

〔図書〕(計1件)

Kawakami R., Nemoto T.

In vivo imaging of all cortical layers and hippocampal, CA1 pyramidal cells by two-photon excitation microscopy, Advanced Optical Methods for Brain Imaging,

(Kao, Keiser, Gogoi,eds.), Nature
Springer (2018)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川上 良介 (KAWAKAMI Ryosuke)

愛媛大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号： 40508818