

研 究 報 告 書

「生体組織深部1細胞の極限解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研 究 者: 磯部 圭佑

1. 研究のねらい

多数の細胞が集合することによって生じる高度な生命現象を解明するためには、細胞集団の平均値としてではなく、細胞の位置情報を保持しつつ細胞1つ1つの個性を解析する必要がある。そのためには、1細胞を分離して解析するのではなく、大きな培養組織や生体組織の深部イメージングによって、細胞集団の中にいる1細胞内の生体分子群が担う分子情報を解析しなければならない。しかし、現在の深部イメージング技術では、その要求を満たすことはできない。

現在、2光子蛍光顕微鏡は深部イメージングにおいて最も有用な技術として用いられている。しかし、それでもなお、観察可能な深さと空間分解能が不十分である。2光子蛍光顕微鏡による生体組織観察では、集光点以外（主に試料表面近傍）で発生する背景蛍光によって、深さ数百 μm が現在の観察限界となっている。しかし、数 mm の深部まで $1\mu\text{m}$ の空間分解能で観察できれば、脳内神経活動、免疫反応、発生・再生、ガンの進展などの理解に飛躍的な貢献をする。また、2光子蛍光顕微鏡では、近赤外領域の長い励起波長を用いることと、実効開口数が低いため、空間分解能が $1\mu\text{m}$ 程度と低い。一方、現在の超解像イメージング技術では試料表面近傍の観察しかできないため、深部イメージングに応用することは困難である。しかし、数百 μm の深さでも 100 nm 以下の空間分解能が得られれば、細胞内微細構造と組織機能の相関解析が可能となる。

本研究では、深部イメージング技術の性能限界を突破し、生体組織内の1細胞解析を可能にする深部イメージング技術を開発する。私はこれまでに、観察可能な深さを制限している背景蛍光を抑制する技術として干渉時空間集光顕微鏡と空間重なり変調非線形光学顕微鏡を提案している。これらの技術では、観察可能な深さと空間分解能のトレードオフの関係を打破し、観察可能な深さと空間分解能を同時に向上できる。本研究では、上記の観察可能な深さや空間分解能を達成できるように、これらの技術を発展させる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、(A)空間重なり変調非線形光学顕微鏡の深部イメージング性能向上と(B)干渉時空間集光顕微鏡の深部イメージング性能向上に関する研究を行った。

研究テーマ A では、まず、10 MHz 以上で2波長パルスの空間的な重なりを変調可能な空間位相変調ユニットを作製し、空間重なり変調非線形光学顕微鏡のイメージング速度を市販のレーザー走査型顕微鏡程度まで向上させた。作製した空間位相変調ユニットを用いて、背景光除去能力を向上させ、観察可能な深さを2倍以上に向上させた。また、2色同時イメージングも達成した。生体組織の深部イメージングでは、生体組織の屈折率分布が一様ではないため、

波面が歪む。そのため、空間分解能が劣化するとともに信号強度が低下する。この問題を解決するために、観察深さごとに、波面歪みを測定し、波面補償を行う手法も確立した。

研究テーマ B では、まず、干渉時空間集光顕微鏡の複雑な光学系を、デジタルマイクロミラーデバイス(DMD)を用いることによって、簡易化するとともに高速化した。次に、2光子蛍光ではなく、3光子蛍光を用いることによって、焦点面以外で発生する背景蛍光をさらに抑制可能な干渉時空間集光顕微鏡を作製した。3光子蛍光を用いるためには、高い励起光強度が必要なため、試料を損傷させないための最適なレーザー光源も開発した。開発した光源を用いることによって、深さ 100 μm でも波長の 1/10 倍である 106 nm の空間分解能が得られた。

(2) 詳細

研究テーマ A「空間重なり変調非線形光学顕微鏡の深部イメージング性能向上」

(A1) 高速空間重なり変調法を用いた非線形光学顕微鏡の開発

図1(a)に示すように、1つのパルスの空間位相を変調することによって、2波長パルスの空間的な重なりを変調できる手法を開発した。図1(b)に示す2波長励起の2光子蛍光を用いると、空間重なり変調によって、図1(c)に示すように、試料表面において発生する蛍光強度は変調せず、集光点において発生する蛍光強度のみ変調できる。また、集光スポット内においても位置によって変調周波数が変化する。そのため、集光スポット中心の変調周波数成分を抽出すれば、観察可能な深さを制限している試料表面で発生する背景蛍光から集光点で発生する信号光を分離すると同時に、空間分解能を向上できる。しかし、液晶デバイスなどの空間位相変調器の応答速度はミリ秒程度と遅いために、ナノ秒で応答可能な空間位相変調ユニットを作製した。位相変調する領域を液晶デバイスで選択し、ナノ秒で応答可能な電気光学変調器で位相変調を行った。その結果、10 MHz 以上で空間位相変調が可能になり、市販のレーザー走査型顕微鏡のレーザー走査速度を実現でき、レーザー走査速度を低下させる必要がなくなった。また、空間位相変調したパルスのみを用いても同様の変調が可能であるため、2色同時イメージングも可能になった。図1(d)にホルマリン固定したマウス脳組織の深部イメージング結果を示す。生きた状態に比べホルマリン固定したマウス脳組織の光の減衰係数は2～3倍低下するため、従来の2光子蛍光顕微鏡では、観察可能な深さが浅いが、その悪条件下でも、変調法を用いることによって、観察可能な深さは2倍以上になっている。

(A2) in-situ 波面歪み測定方法の開発とその補償方法の確立

波面は、干渉計やシャックハルトマン波面センサーを用いれば測定できる。しかし、従来手法では、光学顕微鏡から帰ってきた蛍光や反射光を用いて波面測定が行われていたため、ガイドスターが必要、試料内の散乱があると測定が困難、試料内のどの位置の波面を測定しているのか判別できないなどの問題があった。本研究では、この問題を解決するために、顕微鏡の焦点面において干渉パターンを発生させ、そのパターンを別の光で読み出す波面測定技術を開発した。干渉パターンは、波面測定を行いたいビームの局所領域を参照光として用いたビーム内干渉により発生させた。干渉パターンの読み出しでは、干渉パターンを試料分布とみなし、4光波混合過程を用いた非線形光学イメージングを行った。4光波混合過程は全ての分子から発生するため、ガイドスターは必要なく、試料内の任意の位置で測定でき、その信号光強度に対する励起光強度の依存性から、2光子蛍光顕微鏡と同じ深部イメージング特性(集光点

の断層像取得可能、散乱に対する耐性)を有する。図2に示すように、既知の収差を与え、in-situ 波面測定が可能であることを確認し、マウス脳組織内における波面歪み補償に応用した。波面歪み補償によって、観察できなかった構造が確認できた。

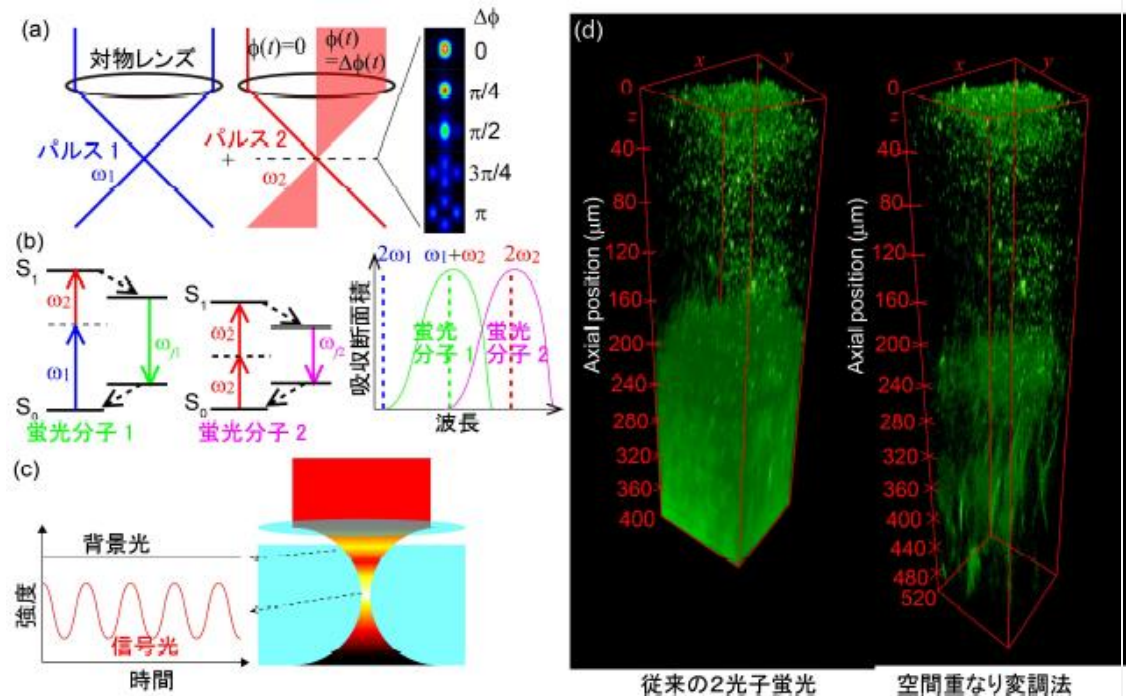


図1. (a) 空間位相変調による空間重なり変調と(b) 2波長励起の2光子蛍光を用いた(c) 時空間蛍光強度変調. (d) ホルマリン固定したマウス脳組織内の深部イメージング

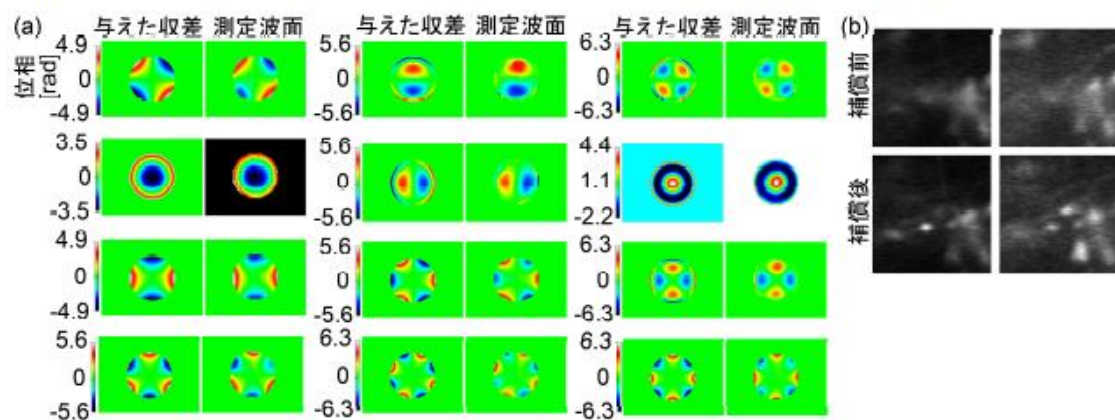


図2. (a) in-situ 波面測定と(b)マウス脳組織内の深部イメージングにおける波面歪み補償。

研究テーマ B「干渉時空間集光顕微鏡の深部イメージング性能向上」

(B1) 干渉時空間集光顕微鏡の高速・簡易化

干渉時空間集光顕微鏡を実現するためには、時空間集光を行うために、フェムト秒パルスを回折格子により分光することと、構造化照明を行うために、ビームスプリッターで2つのビームに分け、位相を精密に制御した干渉縞を発生させることが必要である。本研究では、これらを実現するために必要であった複雑な光学系を、広視野蛍光顕微鏡の試料と共役な位置にデジタ

ルマイクロミラーデバイス(DMD)を配置するだけで実現する干渉時空間集光顕微鏡を構築した。DMD を用いることによって、光学系を簡易化することに成功したとともに、1kHz で照明パターンを更新し、画像を取得することが可能になった。

(B2) 広視野3光子蛍光顕微鏡のための光源開発

2光子吸収断面積が 10^{-49} cm⁴s/photon であるのに対し、3光子吸収断面積は 10^{-83} cm⁶(s/photon)² と非常に小さい。そのため、3光子蛍光を用いるためには、高い励起光強度が必要である。また、広視野を同時に3光子励起しようとすると、非常に高いレーザーパワーが必要になる。市販の2光子蛍光顕微鏡で用いられる繰返し周波数 80 MHz のフェムト秒パルスレーザーの平均パワーを単純に増加させると、熱による試料損傷などが生じると考えられる。本研究では、パルスの繰返し周波数を 200 kHz に低下させ、1パルスあたりのエネルギーを増加させた Yb ファイバー増幅器を作製した。パルス幅 92 fs、パルスエネルギー9 μJ のフェムト秒パルスの発生に成功し、3光子蛍光を用いた時空間集光顕微鏡を作製した。この光源を用いることによって、市販の2光子蛍光顕微鏡用のレーザーに比べ、同じ平均パワーで、 7.5×10^5 倍の3光子蛍光強度が得られる。また、パルスの繰返し周波数を 1 MHz 以下に低下させることによって、蛍光分子の光褪色を抑制できる。レーザー走査を一切行わない広視野照明であるため、繰返し周波数を低下させても画像取得速度を遅くする必要はない。2光子蛍光よりも3光子蛍光を用いた方が焦点面外から発生する背景蛍光を約 100 倍抑制できることを確認した。

(B3) 3光子蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡の開発

DMD を用いた干渉時空間集光顕微鏡に、作製したファイバー増幅器を用い、3光子蛍光を用いた干渉時空間集光顕微鏡を開発した。3光子蛍光を用いることによって、焦点面外から発生する背景蛍光を抑制できるようになったので、深部イメージングにおける更なる空間分解能の向上を実現した。図3に示すように、深さ 100 μm でも波長の 1/10 倍である 106 nm の空間分解能が得られている。分解能が向上したことによって、近接する 100 nm のビーズをはっきり識別できるようになった。また、マウス脳組織内の核のイメージングでは、核膜がはっきりと識別できるようになるなどの超解像イメージングでしか観察できなかった構造を深部イメージングにより実現できた。

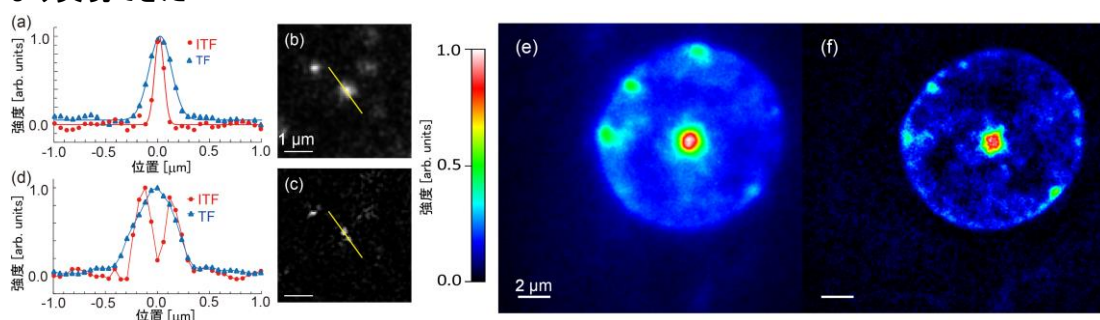


図3. (a)時空間集光顕微鏡(TF)と干渉時空間集光顕微鏡(ITF)の点像分布関数. (b, c) (b)TF 顕微鏡と(c)ITF 顕微鏡によって得られた 100 nm の蛍光ビーズの像. (d) b, c の実線における蛍光強度分布. (e, f) (e)TF 顕微鏡と(f)ITF 顕微鏡によって得られたマウス脳組織内における核の3光子蛍光像.

3. 今後の展開

本さがけ研究で計画していた顕微鏡を開発することに成功したので、in vivo イメージングを行い、生物・医学分野における有用性を確認していきたい。in vivo イメージングの方が、試料の透明度も高いため、深部イメージング性能のさらなる改善が期待できる。また、透明度は高くても波面歪みが大きくなるような試料の観察にも開発した顕微鏡を応用したい。例えば、3次元細胞培養で成長させたスフェロイドは、波面の歪みが大きく、深部観察が困難であると思われる。スフェロイドを切らずに、スフェロイドの内側の細胞を、正常か否か判別できるようになれば、iPS細胞などを用いた再生医療に役立つ。また、薬剤の効果を調べる際に、スフェロイドを大量に作製し、評価を行うなどにも有用だと考えられる。技術的な展開としては、干渉時空間集光顕微鏡で作製した光源のパワーをさらに増幅させ、観察視野を拡げ、脳全体を観察できるように発展させたい。視野を拡げても、レーザー走査を一切行わないため、画像取得時間は長くはならない。広い視野を高い時空間分解能で観察できるようになれば、脳内の複数の細胞がネットワークを形成して行われている高度な生命現象を可視化できるようになると期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究で計画していた顕微鏡技術を開発することに概ね成功したと評価しているが、in vivo イメージングへの展開が残っている。空間重なり変調非線形光学顕微鏡のイメージング速度は市販のガルバノスキャナーを用いたレーザー走査型顕微鏡まで改善できた。背景蛍光の除去によって観察可能な深さは2倍以上に向上、空間分解能は1.4倍向上し、かつ、2色同時イメージングを行えるようになった。まだ、in vivo イメージングを行っていないが、今後進めていく予定である。ホルマリン固定した試料よりも生きた状態の方が、2～3倍程度光の減衰係数が小さくなるので、深部イメージング性能のさらなる改善が期待できる。干渉時空間集光顕微鏡では、3光子蛍光を用いることによって、深部イメージングにおける空間分解能を波長の1/10倍である106 nmのまで向上させることに成功した。この成果では、市販のレーザーではなく、3光子蛍光を最適に発生させる光源を開発できたことが大きい。

研究成果の科学技術への波及効果としては、すでに共同研究を始めているが、生物・医学分野の研究者と脳内などの複数の細胞がネットワークを形成して行われている高度な生命現象の解明に貢献できると考えている。社会・経済への波及効果としては、3次元細胞培養で成長させたスフェロイド中の1細胞を評価できるようになれば、創薬や再生医療などの分野に大きく貢献できると期待できる。また、一部の技術は製品化のための企業への技術移転を考慮した共同研究を始めている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバック・1期生評価会での総括・ADの議論を踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

これまでの性能限界を突破し、生体組織内の1細胞解析を可能にする深部イメージング技術開発という先鋭的な課題に取り組みました。提案した「空間重なり変調法」を用いた非線形光学顕微鏡の開発に成功し、当初の技術開発面での目標は十分に達成されています。さらに、3光子蛍光を用いた「干渉時空間集光顕微鏡」の性能も向上し、進展を見せています。

さががけ「1細胞解析」領域会議での討論では、光学・顕微鏡の専門家として重要な助言・提言を与え、特に本研究領域の1細胞ライブイメージングを目指したいいくつかの研究課題に対して光学・顕微鏡技術面で議論に有益な助言と深みを与えることに大いにも貢献しました。

現在は、同じさががけ領域1期生である小坂田文隆研究者(名古屋大学)の研究室に本顕微鏡をセットアップし、中枢神経系のネットワークなど生命科学の分野でも注目度の高い生体試料のイメージング領域での応用展開を進めており、生物・医学上の課題への取り組む重要なツールとなってゆくことが期待されます。また、SciFos 活動などを通じ、専門領域である顕微鏡業界だけでなく、製薬会社など多様な企業と成果展開の試みが始まっており、オリジナルな顕微鏡の製品化を含めた今後の発展が期待されます。今後の深部顕微鏡観察の分野の第一人者としての活躍を期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Keisuke Isobe**, Keisuke Toda, Qiyuan Song, Fumihiko Kannari, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki, and Katsumi Midorikawa, “Temporal focusing microscopy combined with three-dimensional structured illumination,” Jpn. J. Appl. Phys. (2017), 56, 052501–1–6.
2. Keisuke Toda, **Keisuke Isobe**, Kana Namiki, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki, and Katsumi Midorikawa, “Temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence with a 92-fs Yb-fiber chirped pulse amplifier,” Biomed. Opt. Express, (2017), 8, 2796–2806.
3. Keisuke Toda, **Keisuke Isobe**, Kana Namiki, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki, and Katsumi Midorikawa, “Interferometric temporal focusing microscopy using three-photon excitation fluorescence,” Biomed. Opt. Express, (2018) 9, 1510–1519.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

発 明 者: 磯部圭佑, 緑川克美

発明の名称: 波面歪み量測定装置, 波面補償装置, 光学測定装置, および方法

出 願 人: 国立研究開発法人理化学研究所

出 願 日: 2014/12/26

出 願 番 号: 特願 2014-266374, WO/2016/104223

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. **磯部 圭佑**, 並木 香奈, 河野 弘幸, 宮脇 敦史, 緑川 克美, 「時空間変調技術を用いた多光子顕微鏡の深部イメージング能力向上」レーザー学会学術講演会第 38 回年次大会, 京都, 2018 年1月
2. **磯部 圭佑**, 緑川克美, 「超短光パルスの時空間制御による非線形顕微イメージング」, OPIE' 17 オープンセミナー『バイオイメージングと応用への期待』, 東京, 2017 年 4 月
3. **磯部 圭佑**, 「光学顕微鏡の基本的限界と限界突破技術」, 光とレーザーの科学技術フェア 2016 特別交流シンポジウム「バイオ・医療産業を支える最近のトピックス」, 東京, 2016 年 11 月
4. **磯部 圭佑**, 緑川克美, 「生体試料の深部イメージングを可能にする新しい非線形光学顕微鏡“SPOMNOM”」第 36 回日本レーザー医学会総会, 宇都宮, 2015 年 10 月
5. **磯部 圭佑**, 緑川克美, 「深部イメージング技術の分解能向上」第 67 回日本細胞生物学会大会 レーザー顕微鏡研究会共催企画シンポジウム, 東京, 2015 年 7 月

主要な学会発表

1. **Keisuke Isobe**, Keisuke Toda, Kana Namiki, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki, and Katsumi Midorikawa, “Modulation microscopy for super-resolution deep imaging,” Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young Researchers -Academia Sinica - 4D Cell - ResonanceBio -, Taipei, Taiwan, Nov. 2017.
2. **Keisuke Isobe**, Kana Namiki, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki, and Katsumi Midorikawa, “Deep imaging techniques using spatio-temporal modulation,” Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young Researchers -Academia Sinica - 4D Cell - ResonanceBio -, Taipei, Taiwan, Nov. 2017.
3. **Keisuke Isobe**, Kana Namiki, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki, and Katsumi Midorikawa, “Spatial overlap modulation microscopy using a focal intensity modulator at 10 MHz,” European Conferences on Biomedical Optics 2017, Munich, Germany, Jun. 2017.
4. Keisuke Toda, **Keisuke Isobe**, Kana Namiki, Hiroyuki Kawano, Atsushi Miyawaki, and Katsumi Midorikawa, “Three-photon temporal focusing microscopy combined with structured illumination,” European Conferences on Biomedical Optics 2017, Munich, Germany, Jun. 2017.
5. **磯部 圭佑**, 宋 啓原, 戸田圭亮, 神成文彦, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, 「3次元構造化照明と時空間集光を用いた2光子蛍光顕微鏡」第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋, 2015 年 9 月

受賞

1. **Keisuke Isobe**, The Poster Award, “Deep imaging techniques using spatio-temporal modulation,” Taiwan-Japan Joint Meeting on Bioimaging for Young Researchers -Academia Sinica - 4D Cell - ResonanceBio -, Taipei, Taiwan, 2017 年 11 月 2 日.
2. 戸田圭亮, **磯部圭佑**, 並木香奈, 河野弘幸, 宮脇敦史, 緑川克美, The Best Poster Award,

「三光子励起蛍光を用いた三次元構造化照明顕微鏡」理研シンポジウム第4回「光量子工学研究-若手・中堅研究者からみた光量子工学の展開」 2016年11月1日.

3. **磯部圭佑**, 第3回4D細胞計測若手の会ベストプレゼンテーション賞「空間重なり変調法を用いた2色イメージング」理化学研究所4D細胞計測若手の会 2016年08月31日.

解説論文

1. **磯部圭佑**, 「深部イメージング性能を向上させる多光子蛍光顕微鏡技術」生体の科学, **68**, 394-395 (2017).
2. **磯部圭佑**, 戸田圭亮, 緑川克美, 「励起光パルスの時空間制御による深部超解像イメージング技術」レーザー研究, **44**, 653-657 (2016).
3. **磯部圭佑**, 緑川克美, 「生体試料の深部イメージングを可能にする空間重なり変調非線形光学顕微鏡」OPTRONICS, **417**, 74-78 (2016).
4. **磯部圭佑**, 緑川克美, 「生体試料の深部イメージングを可能にする空間重なり変調非線形光学顕微鏡」日本レーザー医学会誌, **36**, 210-215 (2015).
5. **磯部圭佑**, 緑川克美, 「空間重なり変調による深部観察での背景光を除去する多光子励起顕微鏡」光学, **44**, 18-22 (2015).