生体組織下の3次元細胞内イメージング： 超音波とマルチフォトンの活用*

藤田克昌** 日坂真樹*** 河田 聡****

Three-dimensional Optical Imaging in Biological Tissue -The Use of Ultrasonic and Multiphoton Technology- / Katsumasa FUJITA, Masaki HISAKA, Satoshi KAWATA

Key words: ultrasonic, multiphoton, fluorescence microscopy, three-dimensional imaging, biomedical optics

1. 細胞ではなく、組織

医用光イメージング技術という、細胞内の光学顕微鏡を使った観察技術と生体組織内部の近赤外光CT技術に分けて考えられる。前者は光散乱の十分小さな系であり、バイオブシーや培養細胞技術において実用化されており、後者は脳内の酸素濃度分布など比較的マクロな系の観察技術として提案されている¹⁾²⁾。しかし実際にはそのいずれでもなく、組織内の細胞の観察・分析が求められ、さらにはその制御・手術の技術の開拓が期待されている。生体の活動は細胞の集合体である組織によって営まれており、個々の細胞が独立して存在する場合と組織として集合して存在する場合とでは、その機能に違いがある。独立した細胞個々の働きをとらえても、生体の働きはとらえられない。

*原稿受付 平成13年2月2日

**京都府立医科大学第2病理(京都市上京区河原町広小路堀井町465)

***大阪大学大学院工学研究科(吹田市山田丘2-1)

****正会員 大阪大学大学院工学研究科

藤田克昌

2000年大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻修了、博士(工学)。現在、日本学術振興会特別研究員として京都府立医科大学に所属。これまで、半導体レーザフィードバック、フォトリフラクティブ結晶、多光子吸収過程などを利用した、高分解能、高感度顕微鏡に関する研究を行ってきた。現在は、リアルタイム2光子顕微鏡とその臓器観察応用に関する研究に従事。1998年4月～2000年3月、日本学術振興会特別研究員に採用。1998年11月第5回応用物理学会講演奨励賞受賞。

日坂真樹

2000年大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻修了、博士(工学)。現在、同大学院において中核的研究機関研究員に従事。これまで、半導体レーザと干渉計を用いたカオスの解析、フォトリフラクティブ結晶の分極反転を利用した3次元光メモリなど、非線形性を利用した光計測・制御に関する研究を行ってきた。現在は、光と超音波の相互作用を利用した生体内部の3次元光計測に関する研究に従事している。

河田 聡

1979年大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻修了(工学博士)。1979年カリフォルニア大学アーバイン校電気工学科研究助手。1981年大阪大学工学部応用物理学科助手。1992年同助教授。1993年同教授。現在、大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻教授。日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業「フォトリフラクティブ生体情報計測制御」プロジェクトリーダーを務める。日本IBM科学賞(1997年)、モエヘネシールイヴィトン賞(1997年)、市村学術賞(1998年)ほか、受賞多数。

組織としての細胞群を生きたままとらえ、かつ制御することが、今後の医用光イメージング・光手術のターゲットになるのであろうと考える。

本解説では、生体組織下の数十 μm から数十mmにおける細胞および組織の観察および制御を可能とする技術のうちから、筆者らの最近の研究成果のうち3例を紹介する。これらは、超短パルスレーザによる多光子励起過程および超音波と光の相互作用を活用した、新しい生体組織のイメージング技術である。

光イメージング技術を生体組織の観察に利用する際に問題となるのは、組織内部による光の散乱である。蛍光顕微鏡を例にとると、蛍光が検出器に到達する前に生体組織内で散乱され、その蛍光が試料内のどの部位から来たのかを同定することは困難になる。生体組織内では光は直進しないで散乱することを認識し、そのような環境下においてもイメージングするためのアイデアとブレイクスルーが必要となる。本解説の3例はその解決策であると言える。

2. 数十 μm オーダの組織下の細胞内動的イメージング：2光子顕微鏡の活用

細胞組織内部での光散乱を押さえるには、波長の長い光を用いればよい。ところが、一般の蛍光計測では、用いる蛍光色素による励起波長の制限から、紫外～可視域の光のみが励起光として使用されてきた。波長の長い光(例えば近赤外光)を用いて可視域の蛍光を得ることができれば、励起光の散乱を抑え、組織のより深部の観察が期待できる。そのためには、近年提案された2光子励起法を用いればよい³⁾。2光子励起では、1つの蛍光分子が2つのフォトンと同時に吸収し、1つの蛍光フォトン放出するため、従来よりも約2倍長い波長の光を励起光に用いることができる。2つのフォトンが蛍光色素に同時に吸収させるためには非常に高密度のフォトンを試料に供給する必要があるが、近年になって普及した近赤外超短パルスレーザを用いれば、この現象を顕微鏡下で比較的容易に得ることが

図1 1光子励起と2光子励起での蛍光発光の違い

でき、その実用例も徐々に発表されてきている⁴⁾⁵⁾。

図1に、1光子励起（従来の蛍光顕微鏡）と多光子（2光子）励起との比較を示す。1光子励起による蛍光の強度は励起光の強度に比例するため、試料の照明された領域全体からの蛍光発光が見られる。それに対し、2光子励起を用いた場合は、蛍光の強度は励起光の強度の2乗に比例するため、焦点部位のみに蛍光発光が局在化できる。この蛍光発光点を3次的に走査すれば、試料の蛍光強度分布を得ることができ、試料の3次元構造を再構築することができる。2光子励起では、励起光の波長は1光子励起に比べ約2倍と長い（励起エネルギーが約半分）ため、試料内での励起光の散乱が少なく、試料のより深い部分での蛍光励起が可能となる。しかも、焦点以外の部位での蛍光励起を行わないため、背景光が1光子励起に比べ大幅に少なく、観察面以外での蛍光の褪色がない。

このように2光子励起法は試料内での光散乱を抑えるだけでなく、試料に与えるダメージを少なく抑えることができる。そのため、2光子蛍光顕微鏡は、生体を生きたまま観察し、その機能の解析を行えるツールとして適していると言える。

そこで我々は、動きのある生体を生きたままでも観察が可能な多光子蛍光顕微鏡の開発を行ってきた⁶⁾⁷⁾。図2に、我々が開発した実時間観察可能な2光子蛍光顕微鏡の光学系を示す。光源のモードロックチタンサファイアレーザ（波長800 nm、パルス幅80 fs、繰り返し周波数82 MHz）からの光はマイクロレンズアレイに入射し、複数の焦点をピンホールアレイ上に形成する。各ピンホールを透過した

図2 実時間2光子共焦点顕微鏡の光学系

図3 ラット摘出心の観察

光は、対物レンズにより試料上に集光され、各ピンホールを試料内に結像する。試料内の各焦点において2光子励起による蛍光発光が得られ、各焦点からの蛍光は励起に用いられた対物レンズ、およびダイクロイックミラーを経た後、インテンシファイド CCD カメラ上に結像される。マイクロレンズアレイとピンホールアレイを同時に回転させることにより、各励起点は試料内を高速に走査し、インテンシファイド CCD カメラにより2光子蛍光画像をリアルタイムに得ることができる。試作した顕微鏡では、1800 rpm の速度で各ディスクを回転させることにより3 ms の走査速度を実現した。このときのマイクロレンズ、ピンホールの直径は、それぞれ、250 μm 、50 μm であった。また、蛍光の検出はピンホールアレイを通して行う共焦点検出であるため、観察像の高分解能化、高コントラスト化が期待できる⁷⁾。

開発した装置を用いて、ラット摘出心内での筋細胞の収縮を促すカルシウムイオン動態の観察を行った⁸⁾。ラット体内より摘出された心臓は、蛍光カルシウムイオン指示薬 (Fluo-4/AM) を負荷された後、そのまま顕微鏡対物レンズ下に置かれ観察された (図3)。観察の間の摘出心の延命のため、疑似血液により摘出心を灌流した。図4に、ラット摘出心筋内カルシウムイオン動態の観察結果を示す。それぞれの結果の観察深さは、摘出心表面より約30 μm であった。図4 (a) はラット摘出心の拍動に同期して生じるカルシウムイオン濃度の上昇 (トランジェント) を示しており、視野内すべての心筋細胞において同時にカルシウムイオンが上昇している様子が観察されている。図4 (b) は、1つの心筋細胞内において部分的にカルシウムイオン濃度が上昇し、それが細胞内を伝搬する様子 (ウェーブ) を示している。通常、心筋内のカルシウムイオン濃度の上昇は、ペースメーカー細胞からの信号により同期的に起こるため、このような非同期的なカルシウムイオン濃度の上昇は異常であり、不整脈とのかかわりがあるとして現在研究が行われている現象である。以上の結果において、その心筋の厚さ (～1.0 cm) にもかかわらず、非常にコントラストの高い蛍光像が得られている。また、本研究において、現時点での観察限界 (観察深さ、観察速度) は蛍光の発光強度の不足が原因となっているという結果も得られ

(a) Ca^{2+} トランジェント

(b) Ca^{2+} ウェーブ

図4 ラット摘出心内のカルシウムイオン動態の2光子観察像
(a) カルシウムイオントランジェント
(b) カルシウムイオンウェーブ

た。今後、より高出力の近赤外パルスレーザや多光子励起に適した蛍光プローブの開発が行われれば、本研究の成果をこれまでの限界を超えた組織イメージング技術として応用できると考えている。

3. 数十 μm オーダの細胞内光ナノ手術： 多光子レーザアブレーションの応用

多光子顕微鏡に用いるパルスレーザを生体試料内に集光させ、その強度を蛍光励起に用いられる強度よりさらに大きくした場合、多光子課程による誘電破壊が起こり、レーザアブレーションによる生体組織を破壊（加工）することが可能である⁹⁾。図5は、我々による赤血球の細胞膜のアブレーション結果を示す¹⁰⁾。矢印で示された開口部の大きさが、約200 nmであることが分かる。この手法を用いれば、生体組織内の細胞を加工でき、その組織の形態変化を

図5 レーザアブレーションにより切断された赤血球のSEM像

任意に行うことができる。組織形態の変化に対する細胞（および組織）の機能変化については、その事実については認められているが、いまだ細かな研究例はない。組織形態を任意に変化させその機能の変化を解析するという、医用光学分野においても新たな計測手法になり得るのではないかと考える。

4. mm オーダの組織深部の光CT観察： 超音波パルスの活用

観察する組織の深さがmmオーダになると、2光子励起法をもってしても光散乱の影響を抑えられなくなる。このような深さになると、光のみを用いて試料の光学特性を観察・計測するのは難しく、光以外のサポートを得る必要がある。

そこで、我々は光と超音波の相互作用を利用した光計測技術の開発も行ってきた^{11)~13)}。超音波は光に比べると生体組織によって散乱されにくい性質を持つ。そのため、生体組織深部であっても超音波であれば狙った部位に収束させることができ、試料内の測定位置を特定することができる。光と超音波の相互作用を利用した散乱体中の計測法は、その有効性を欧米の研究グループによっても認識され、近年精力的に研究・開発されている¹⁴⁾¹⁵⁾。

図6に我々の開発している超音波を利用した生体組織の光計測の実験系を示す。レーザ光は中央に開口を持つ超音波トランスデューサヘッドの背面から入射して試料に照射し、同時にその部分に収束パルス超音波を照射する。レーザ光は試料内部で拡散されるが一部はパルス超音波によって散乱される。超音波の収束部位を通過した光は超音波と強く相互作用することで変調を受ける。そのため、散乱光のうちの超音波による変調成分のみを取り出すことにより、超音波の収束部位を透過した光のみの透過強度を求めることができる。超音波と光の相互作用で光が受ける変調の強さはその部位の物質の複素屈折率（吸収）で決まるため、検出された変調成分は超音波の収束部位の吸光度を反映している。また、パルス状の超音波を利用すれば、パルス照射開始からの時間が計測位置の深さを決定するため、

図6 超音波を利用した生体組織の光計測の実験系

散乱光の時間変化を測定することにより奥行き方向の情報も得ることができる。ただし、この場合の奥行き方向の観察範囲は、超音波の焦点深度により決定される。

試作光学系を用いて、吸収物体を試料中に包埋した試料を観察した。測定試料はRTV シリコンゴム内に散乱体としてイントラリピッドを分散し、吸収物体としてビクトリアブルーで染色した繊維を深さ2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mmに埋めたものを用いた。この時、超音波は、圧電セラミックスにパルス幅 $0.5 \mu\text{s}$ 、繰り返し周波数 1 kHz 、振幅 12.0 V の矩形波状の電圧を印加して発生させられ、光源には光束径 1.0 mm 、強度 0.54 mW の He-Ne レーザ、光検出器には PIN フォトディテクターを用いた。

図7に得られた観察結果を示す。図中の z 軸は試料の奥行き方向に対応し、 $z=0$ が試料表面に対応している。プロットの高さは信号強度を示している。それぞれの吸収物体に対して信号が変調を受けた遅延時間を見ると、パルス超音波が試料に入射した時点からそれぞれ2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 μs 遅れて観測されていた。試料中の音速 (1000 m/s) から遅延時間を深さに換算すると、それぞれ2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 mm に対応しており、試料中に吸収物体を包埋した深さと一致した。現在のところ本実験系を用いて試料表面からおよそ 10 mm 程度の深さまで観測することに成功している。この手法は、皮下の血管の3次元観察やマンモグラフィに応用できると考えられる。さらに、試料からの反射光を観察する反射型光学系に発展させれば、試料の厚みや形状に束縛されずに *in vivo* で試料を観察できることが期待される。

参考文献

- 1) 石川春律, 高松哲郎編著: 新しい光学顕微鏡, 第2巻, 学際企画 (1995).

図7 散乱体中の光吸収物体の光学断層像

- 2) 田村 守: 光 CT の開発—その歴史と現状, O plus E, **21**, 7 (1999) 808.
- 3) W. Denk, J. Strickler, W. Webb: Two-photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy, Science, **248**, 4951, (1990) 73.
- 4) K. Svoboda, W. Denk, D. Kleinfeld and D. Tank: In Vivo Dendritic Calcium Dynamics in Neocortical Pyramidal Neurons, Nature, **395**, 6612, (1997) 161.
- 5) D. Piston, M. Kirby, H. Cheng, W. Lederer and W. Webb: Two-Photon-Excitation Fluorescence Imaging of Three-Dimensional Calcium-Ion Activity, Appl. Opt., **33**, 4, (1994) 662.
- 6) K. Fujita, O. Nakamura, T. Kaneko, M. Oyamada, T. Takamatsu and S. Kawata: Real-time Imaging of Two-Photon Induced Fluorescence with a Microlens-Array Scanner and a Regenerative Amplifier, J. Microsc. **194**, 2/3, (1999) 528.
- 7) K. Fujita, O. Nakamura, T. Kaneko, M. Oyamada, T. Takamatsu and S. Kawata: Confocal Multipoint Multiphoton Excitation Microscope with Microlens and Pinhole Arrays, Opt. Commun., **174**, 15, (2000) 7.
- 8) 藤田克昌, 金子智行, 中村 収, 小山田正人, 高松哲郎, 河田聡: 2光子共焦点顕微鏡による細胞内 Ca^{2+} 動態の実時間観察, 第48回春期応用物理学学会予稿集 (2000) 1034.
- 9) K. Konig, I. Riemann, P. Fischer and K.J. Halbhauer: Intracellular Nanosurgery with Near Infrared Femtosecond Laser Pulses, Cell. Mol. Biol. **45**, 2, (1999) 195.
- 10) N. Smith, K. Fujita, O. Nakamura and S. Kawata: Three-Dimensional Subsurface Microprocessing of Collagen by Ultra-short Laser Pulses, Appl. Phys. Lett. (accepted).
- 11) 日坂真樹, 杉浦忠男, 河田 聡: パルス超音波と光の相互作用を利用した散乱体深部の光断層像観察, 光学, **29**, 10 (2000) 631.
- 12) M. Hisaka, T. Sugiura and S. Kawata: Ultrasound-Assisted Optical Reflectometry in Highly Scattering Media, Jpn. J. Appl. Phys. **38**, (1999) L1478.
- 13) M. Hisaka, T. Sugiura and S. Kawata: Optical Cross-sectional Imaging with Pulse Ultrasound Wave Assistance, J. Opt. Soc. Am. A., (accepted).
- 14) L. Wang, S. Jacques and X. Zhao: Continuous-Wave Ultrasonic Modulation of Scattered Laser Light to Image Objects in Turbid Media, Opt. Lett., **20**, 6, (1995) 629.
- 15) S. Leveque, A. C. Boccara, M. Lebec and H. Saint-Jalmes: Ultrasonic Tagging of Photon Paths in Scattering Media: Parallel Speckle Modulation Processing, Opt. Lett. **24**, 3, (1999) 181.