非侵襲生体光イメージング技術とは？ ～真の生命現象を捉えるために～

本藏直樹*

Noninvasive intravital imaging techniques: In order to capture genuine physiological responses

Naoki HONKURA

Key words: intravital imaging, nonlinear optics, vascular physiology

1. はじめに

近年、高詳細に細胞・組織を観察するための光イメージング技術は、筆者のような非線形光学顕微鏡に精通した研究者でなくとも、顕微鏡会社から発売された製品版の多光子励起顕微鏡や超解像顕微鏡などを利用することで、高度イメージング技術を手軽に使用できる機会が増えている。これらの技術は、生体微細構造を解像良く画像化することで今までの技術では観察できなかった生体現象を、細かな時空間解像で捉えることのできる非常に優れた技術であり、また他の方法論で取得できない多次元情報を内包した画像として取得できる。本技術講座において、特に非侵襲生体光イメージング技術を用いた血管イメージングに絶対に必要な最低限の知識をより基礎的なことから順を追って説明していくことにする。

2. 生体光イメージング技術に用いられる多光子励起顕微鏡とは？

はじめに蛍光観察に使用する顕微鏡に関して、簡略的に説明を行うこととする。蛍光観察に使用される顕微鏡として、蛍光顕微鏡が存在する。この顕微

鏡は高強度の白色光源、たとえば水銀灯などを用い、その光を観察したい物質固有な励起スペクトルに沿った光学フィルターを選択することで、その蛍光物質を効率よく励起する。励起された蛍光物質が、基底状態に戻る際に蛍光を発する(図1)。この蛍光を捕らえ、蛍光物質の存在位置や挙動を時間経過が観察できる顕微鏡を蛍光顕微鏡という。さらに蛍光顕微鏡を発展させたものが、共焦点レーザー走査型顕微鏡になる。その中でも特によく用いられる方法として光源にレーザー光を用い、鏡(ガルバノミラー等)を動かすことでレーザー光を走査し、画像を取得する。さらに光学ピンホールを対物レンズの共焦位置に設置することで、焦点面のみの画像を取得することが可能となった。しかしこれらの顕微鏡では、*in vivo* 観察において克服できない問題点、たとえば組織散乱や界面の複屈折などの問題が多数存在する。そのため組織表層からわずか10~20 μm程度の深さであっても、解像よく画像を取得することは困難を極める。それを克服するために光源を超短パルスレーザーに換え、焦点位置においてのみ多光子励起を生じさせることで、これらの問題を一部克服する能力を有する顕微鏡が多光子励起顕微鏡である¹⁾。

3. 2(多)光子励起顕微鏡の歴史的背景

多光子励起過程の理論的な概念は、優れた近代科学者たちが様々な理論を打ち立てた量子力学全盛期、1931年に Maria Goppert-Mayer(マリー・キュリー

*責任者連絡先:

浜松医科大学医学部医学科医生理学講座
〒431-3192 静岡県浜松市東区半田山一丁目20番1号
Tel: 053-435-2249, Fax: 053-435-2249
E-mail: pon@hama-med.ac.jp

図1 ヤブロンスキーダイアグラム

に次いで2人目の女性ノーベル物理学賞受賞者(昨年55年ぶりに Donna Strickland が超短パルスレーザーの出力を強烈に高める方法, チャープパルス増幅法の開発により3人目の女性ノーベル物理学賞受賞者が誕生))によって初期理論が提唱されたが, その当時このような励起過程は存在し得ない現象であると考えられていた²⁾. しかしアインシュタインが提唱した, 誘導放出の概念を用いた非常にバンド幅が狭い高強度光源, すなわちレーザー光の誕生によってようやく1961年, これらの現象が実験的に初めて観測された³⁾. その後1990年, 生物学でも適用可能な多光子励起顕微鏡のさきがけとなる顕微鏡の開発が Webb らによって報告された¹⁾.

4. 2(多)光子励起顕微鏡の原理および特徴の概要

2光子励起は蛍光分子に光子2個のエネルギーをほぼ時間遅れなく(10^{-15} 秒)同時に1分子に作用することで, 分子を励起する現象である. また光子のエネルギーは波長に反比例しているため, 通常単光子励起(一般的な共焦点レーザー走査顕微鏡等)の2倍の波長の励起光を用いて2光子吸収を生じさせることが可能となる. この際2光子吸収が起こる効率は, 光子密度の2乗に比例して増加する. すなわちまとめると, 極短時間に非常に高い光子密度を要求

すること, 言い換えると超高強度の光源が必要となることを意味している. ただこれは生物サンプルに強烈な光を照射すると, 光照射領域の多数の分子が光励起され, その分子の一部は光放射ではなく熱放射としてエネルギーを近傍へ放出するため, 組織自体が焼けてしまう(熱傷害). すなわちただ単に入射光のエネルギーを強くするだけでは, 実現できない. また詳細は割愛するが, ただ単に入射エネルギー量をあげるだけでは, とても2光子励起および吸収を誘導するだけの光子密度を確保できない.

これを実現するために光源に超短パルスレーザーを用いて, 一定時間あたりのエネルギー照射量を抑えることで組織のやけを生じさせず, また極短時間における光子密度すなわちエネルギー量を爆発的に増大させることが可能となる. これを非常に簡略化して説明すると, ライターの火でサッと皮膚をあぶっても熱傷しないが, ホッカイロ程度の熱であっても連続で当て続けると, 低温熱傷を起こすことを想像していただけるとよいかもしれない. すなわちフェムト秒(10^{-15} 秒)程度の時間幅を持つ超高強度光を組織に照射することで2光子励起を誘導し, またその後エネルギーを与えない, すなわち光を照射しないことで(10^{-8} 秒程度), サンプルへの平均のエネルギー照射量を抑えることで, 組織の焼けが起こらないようにすることが可能となる($1/10,000,000$

図2 1光子と2光子励起領域の違い

間だけ光照射)。これを繰り返すことで、サンプルに与える平均のエネルギー照射量を1光子励起過程と同程度に抑えながらも、連続的に2光子励起を行うことが可能となる。また先に説明したように、光子密度の2乗に比例して2光子励起が生じるため、すなわち励起光が絞り込まれた対物レンズの焦点位置のみで2光子励起が起こることより、蛍光の発生も焦点位置のみに生じる¹⁾。このことからピンホールなどを使用せずとも、断層像の取得が可能となり、また不要な光退色や光傷害を軽減することが可能となる(図2)。

これらのことを含めた2光子励起顕微鏡の主な特徴と利点を共焦点レーザー顕微鏡と比較し、以下の①～⑤にまとめた。

① 同時多重染色イメージング

2光子励起の励起スペクトルは、一般的に単光子による励起スペクトルと比べて広がる傾向がある。これは励起光のバンド幅の広さ、および複数のエネルギー準位への遷移が関与されていると考えられているが、まだ詳細はわかっていない⁴⁾。この利点を有効利用することにより、共焦点レーザー顕微鏡では不可能であった、単一光源による多重染色の組み合わせ数⁵⁾が、非常に増えた(例えば、GFPとRFPの単一光源による同時励起など)。

このことは多色の情報を同一局在と見なせること、すなわち焦点面1点から生じた異なる蛍光を分離・検出しても、光学系の色収差の問題はほとんど回避できることを意味することより、厳密な複数種(色の違いより)の分子局在の議論が可能となる。特に超解像顕微鏡などと組み合わせることで(この場合はSTED法であれば可能)、より詳細なナノスケールの分子局在を多色で議論することが可能となるであろう。

② 局所領域での光化学反応

蛍光退色回復法(FRAP)、光活性化(PAF)、あるいは、ケイジド化合物^{注1)}を光反応で活性化したり解離を誘導したりする場合、2光子励起法を用いれば厚みのある試料でも、任意の場所に $0.1\mu\text{m}^3$ 以下の空間のみで反応を起こすことが可能である⁵⁾。また組織内の任意の細胞(例えばがん細胞等)に対し、光照射による脱落(細胞死)を誘導することも可能である。また光遺伝学^{注2)}を組み合わせることで、組織中の単一細胞にのみ遺伝子発現を誘導、シグナルの活性化など、生きた生体の多細胞生物中に存在する単一細胞の挙動とその分子構成および活性化を人為的に操作できる系として用いることができる。すなわち生体の生きた細胞一つずつを光を用いることで非侵襲に高い

時空間解像を有して操作・制御することができる。

③ 励起光の試料透過性 (*in vivo* 観察に適している)

励起光源に近赤外光を用いるため、可視光に比べ生物試料による吸収・散乱を受けることが少なく、より標本深部への到達が可能となる。また近年盛んに研究されているビーム再生および透過技術⁶⁾を用いることで、さらなる深部到達性を実現できると考えられる。また将来これらの特性から人の画像診断等への応用も十分に考えられる(すでに一部は医療機器として展開が始まっている)。

④ 紫外線励起光源の代価(組織へのダメージ軽減)

近赤外光を用いて、Q-dot、カルシウム感受性蛍光色素やDNA染色蛍光試薬などの励起、およびケイジド化合物の活性化等を行える。

⑤ 他多数、さらなる詳細に関しては文献5を参照されたい。

これらの特徴をうまく利用することで、これまで不可能であった研究が可能となった。特に共焦点レーザー顕微鏡ではほぼ不可能であった *in vivo* の研究が盛んに行われるようになってきている。以下は多光子励起顕微鏡の特徴①～⑤を活かした研究の一例を筆者が報告を行った論文を抜粋して記載する⁷⁻⁹⁾。

5. 多光子励起顕微鏡の特性を活かした生体機能・構造イメージング

筆者は高等動物を生きたまふ非侵襲に観察することで、真に生理的な条件下で生体反応を捉える研究に興味を持って行ってきた。早い生命反応をリアルタイムに捉えるために、独自の非線形光学顕微鏡を構築した。それに加えて光プローブおよびケイジド化合物^{注1)}を組み合わせることで、非常に高い時空間解像を有した光操作および観察を行い、実際の神経伝達を模倣した細胞間情報伝達を人工誘導し、記憶の素過程である神経可塑性および安定性に関する重要な分子・生理基盤を発見した^{7,8)}。この際従来の研究では、ほぼ不可能であったそれぞれのシナプス入力を光の操作によって制御することで、ほぼ同時に多数の入力を人為的に行うことが可能となった。またこの際、光照射を制御することで神経入力制御できることから、入力依存的な微細なアクチン

線維の挙動の計測が可能となりその結果、アクチン線維の硬さの動的制御により決定されるスパインの構造安定性が、記憶の定着に重要であると提唱できた。これらの方法論は、決して脳神経領域だけで利用できるものではなく、すべての生命現象において使用できる有用な方法論である。そのため今まで技術的困難さにより、ほとんど手がつけられていなかった循環器に着目し、生命維持において最も大切な物質の輸送制御機構の研究を行った。

6. 非侵襲生体光イメージング技術を活かした血管機能・構造解析

血管・循環器は生体を維持・調節するために絶対必須の器官であり、それなくして生命を維持することができない。またこの血管の中核を担うのが物質交換の場である微小循環である。物質交換を通じて局所(臓器)の恒常性が保たれると同時に、物質交換を通じて局所(臓器)の情報の多くが全身に拡散する。これにより臓器・臓器間の情報伝達が可能になり多細胞生物の生命体としての応答、恒常性維持が可能になる。このように組織および生体の適応・応答、恒常性維持における微小循環の重要性は明らかであり、時空間的に制御されるその調節機構の詳細を明らかにすることは極めて重要である。その機構を正確に記述するためには人工的環境ではなく、自然な血流が存在する状態、すなわち生きたままの動物を非侵襲で計測する実験系を用い、真の血管機能を計測することは必須である。しかしながら少しでも組織侵襲があれば容易に出血が起こるため、これまで真の物質交換を含めた微小循環の機能を見極めることはほぼ不可能であった。言い換えると、計測系の進歩が律速で本研究分野が遅れているとも考察できる。著者の確立した非侵襲生体光イメージング技術は、一切の出血およびその他侵襲が生じない利点を有するため、これらの問題に対応することが世界で初めて可能となった⁹⁾。

その結果、血管成長因子および様々な液性因子の作用に応じて大きな分子は毛細血管中後部および細静脈でのみ、物質放出が行われることが判明した。またこの物質放出が起こる領域は、タイトジャンクションの構成タンパク質クローディン5の発現が見

られない領域でのみ生じることが判明した。さらに細かな解析により血管種依存的な開閉制御機構の存在を初めて明らかにした。これらの結果より、細動脈系およびタイトジャンクションの強度が強い毛細血管前領域において、少なくとも大きな分子の物質交換がほとんど行われていないことが明らかになった。これは、スターリングの仮説で想定されていた毛細血管前領域での物質流出および毛細血管中後部での老廃物回収の考えを根本から覆しており、新たな仮説の提唱および真のメカニズムの解明が必要となる。また新たに独自開発したイメージ解析法である、血管種別別・血流速度・構造変動解析法(RVDM法)を用いて、物質放出が生じた領域に局限して、血流速度の低下および血管拡張が起こることも見出した。これらの結果は物質移動が時空間的に制御されているだけでなく、血管そのものの構造・機能変化を誘導することで長期間、局所生体環境を動的に制御していることを示唆している。またこれと同時にそれに関わる分子・細胞レベルの生理現象を、細かな時空間解像で解析する手法が世界で初めて確立したことを意味する。この手法は将来的に、今まで解明できていなかった特定物質の能動・受動供給機構、言い換えると、“いつ・どこで・どのように”血中に含まれる生理活性物質が特定組織に局所環境変動に応じて供給されるのか？ またその際の血流速度・血圧変化や辺縁組織機能の関係などを含んだ全身性および局所性の生体環境変動との関係を解明することができると考えられる。

7. まとめ

本稿で示してきたように非侵襲生体光イメージング技術は、今後多種多様な生物医学研究において他に替えの利かない重要な方法論として多用されることは間違いない。しかしこれらの研究を遂行するためには、様々な知識が必要となること、さらには解析においては光学だけでなく数学的要素、情報技術の知識など、生命科学の研究者にはなかなかハードルが高い。しかしながら多くの革新的研究は、計測技術の進化とともに歩んできた歴史が証明するように、生命・医科学の研究者にも物理学を含んだ横断的学問の統合的理解が大切であることを説き、新技

術を活用するとかかりとして本稿がその助けとなることを期待し締めとしたい。

注1：ケイジド化合物

生理活性を持つ分子の側鎖に不活性な基を付加することで生理活性を抑える化合物を作製する。その付加した側鎖が光の吸収により、切断するように加工された試薬をケイジド試薬と呼ぶ。すなわち光を照射された場所でのみ、生理活性を持つことができる化合物の総称である。代表的なものとして、ケイジドグルタミン酸、ケイジドCa²⁺、ケイジドGABA、ケイジドcAMP、ケイジドIP₃などが存在する。

注2：光遺伝学

光+遺伝学(opto+genetics=optogenetics: オプトジェネティクス)の2つが融合した学問を意味する造語。2006年Deisseroth氏が提唱した概念。代表的な光遺伝学のプローブとして膜タンパク質チャネルロドプシン2があり、青い光を受けると開口し、陽イオンを透過させる機能を持つことで、神経細胞の活動電位を光により操作できる画期的な方法論。現状光照射によって遺伝子発現制御であったり、光依存的Creタンパク質活性化などでゲノム編集などでもできるようになってきている。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Denk W, Strickler JH, Webb WW: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**: 73–76, 1990.
- 2) Göppert-Mayer M: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* **401**: 273–294, 1931.
- 3) Kaiser W, Garrett CG: Two-Photon Excitation in CaF₂: Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.* **7**: 229–231, 1961.
- 4) Drobizhev M, Makarov NS, Tillo SE, Hughes TE, Rebane A: Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nat Methods* **8**: 393–399, 2011.
- 5) 本藏直樹 光イメージングから光操作へ 病理と臨 **30**: 762–767, 2012.
- 6) Yilmaz H, Hsu CW, Yamilov A, Cao H: Transverse localization of transmission eigenchannels. *Nat Photon* **10**: 1038/s41566-019-0367-9, 2019.
- 7) Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H: Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**: 761–766, 2004.
- 8) Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H: The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* **57**: 719–729, 2008.
- 9) Honkura N, Richards M, Laviña B, Sáinz-Jaspeado M, Betsholtz C, Claesson-Welsh L: Intravital imaging-based analysis tools for vessel identification and assessment of concurrent dynamic vascular events. *Nature Communications* **9**: 2746, 2018.