



Title	2光子顕微鏡法を用いた補償光学による生体組織深部の可視化解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山口, 和志
Citation	北海道大学. 博士(情報科学) 甲第14592号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/81412">http://hdl.handle.net/2115/81412</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Kazushi_Yamaguchi_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（情報科学） 氏名 山口 和志

### 学位論文題名

2光子顕微鏡法を用いた補償光学による生体組織深部の可視化解析  
(Two-photon microscopic characterization within deeper layers in biological tissues utilizing adaptive optics)

生体組織の正常な機能の維持には細胞間の物理・化学的な相互作用が必須である。組織の生理機能を記述する上では、これらの相互作用を損なわない低侵襲な計測手法が求められる。蛍光顕微鏡法は非接触かつ単一細胞レベルでの計測が可能だが、組織内部の計測は困難だった。そこで、組織の三次元構造を保ちつつ、非侵襲的に計測できる2光子顕微鏡法が開発された。2光子顕微鏡法は可視域の蛍光物質の励起に際して、生体組織の透過性が高い近赤外光を用いる。そのため、通常の蛍光顕微鏡法と比べて、組織のより深部から蛍光信号を取得できる。また、励起効率が光子密度の2乗に比例することから励起範囲が集光点付近に限局するため、共焦点顕微鏡のような共焦点検出系を用いることなく光学断層像が取得できる。さらに、焦点以外での光吸収が起こらないことは、本法に低侵襲性の特徴を与える。この特徴を活かし、組織の局所的な刺激や障害に応用され、細胞間の相互作用の解析、損傷モデルの確立に貢献している。本研究では2光子顕微鏡法の貢献が大きい(1)神経科学領域と(2)がん領域に着目し、それら2領域の進展に貢献する要素技術開発を目指した。

(1)神経科学領域では、三次元的に広い範囲における細胞の可視化や神経細胞間の情報伝達のあるシナプスの構造の可視化技術が求められている。2光子顕微鏡による生体脳観察時の到達深度や空間分解能が制限される原因は、吸収と散乱による励起光強度の低下と、収差に起因した焦点体積の増大による励起効率の低下にある。収差は試料を含む観察系内部の屈折率界面で生じるが、系の屈折率差の低減や光波面の適切な変調によって補正できる。この様に積極的に収差を補正するアプローチは補償光学と呼ばれ、顕微鏡法への利用が注目されている。例えば近年、空間光位相変調器(SLM)を顕微光学系に導入することで、マウス生体脳深部のシナプス構造が可視化された。しかし、SLMを用いた光学系の構築には光学に関する高度な専門知識が求められ、生命学者による利用に高い障壁があった。脳機能や疾患の解明には膨大な量の基礎研究が必要であり、その方法論は多くの生命学者にとって簡便でなければ実用に至らない。以上を踏まえ、利用の障壁が低い簡便な2光子顕微鏡の改良法の開発が必須と考えた。本論文では、二種の簡便なアプローチに基づく補償光学技術を考案し、2光子顕微鏡によるマウス生体脳イメージングに適用した。一つ目として、励起レーザー光のビーム径と対物レンズの浸液の屈折率を調整し、脳深部の2光子励起効率を向上させた。また、二つ目として、既存の顕微光学系にSLMを簡便に外部導入する方法論を確立し、屈折率界面の形状情報を利用して収差補正を行う手法を開発した。

まず、ビーム径と浸液の屈折率の調整のために、マウス生体脳内部における焦点体積を可視化・解析する手法を開発した。本手法を用いてビーム径を調整したところ、対物レンズの瞳径に対して3分の2に絞った場合に、脳深部の焦点体積を増大させることなく対物レンズ下で2.3倍の励起光強度を得ることに成功した。また、同手法を用いて浸液の屈折率を1.33-1.37まで0.01刻みで変えたところ、屈折率が1.35もしくは1.36のときに脳内の焦点体積が最小になった。ビーム径を3分の2に、浸液の屈折率を1.36にそれぞれ変更した条件(至適条件)を用いて、生体脳観察の深部到達性を評価した。通常の観察条件では大脳皮質下にある白質を観察できなかったが、至適条件を用いることで白質だけでなく海馬白板、海馬CA1細胞も可視化できた。また、大脳皮質全層でのシ

ナプス構造の可視化も達成した。さらに至適条件を用いることで、Ca<sup>2+</sup> イメージングや局所破壊技術の高度化にも成功した。至適条件は極めて安価に実装でき、複雑な光学系の再調整も一切必要としないため、生物・医学者が広く利用可能な特色を有する。

また、より複雑な収差を補正するために SLM を既存の顕微光学系に外部導入した。具体的には、励起光路に SLM と 2 枚のレンズから成るリレー光学系を挿入するのみで、対物レンズ瞳面における励起光波面の位相分布を制御することに成功した。さらに試料の表面形状の三次元情報を基に、光線追跡によって試料内部で発生する収差量を推定し、SLM に与える補正パターンを算出するプログラムを作成した。様々な異なる形状の界面を持つ試料で原理実証を行った結果、複雑な光学収差も補正できることが確認できた。更に、本手法の適用によって、これまで観察報告のないマウス生体脳第二次運動野領域第 V 層のシナプス構造の可視化を実現した。本手法は光線追跡法を用いて緻密に補正パターンを算出するため、複雑な形状の試料や空間分解能に優れた対物レンズにも適用できる点が既報から大きく異なる新規点である。また、本手法は試料の表面形状の情報を基に補正パターンを決定するため、試料深部の観察対象部位を一度も走査する必要がなく、光毒性や光褪色が起こりにくい利点もある。本手法を用いることで第二次運動野深部のシナプス構造が可視化できたため、運動障害を伴う疾患の発症・進行機構の解明など様々な生物学的課題の解明に貢献することが期待される。

(2) がん領域では、治療法の確立のために固形がん形成の機構の解明や薬剤応答の解析が必須である。そのためには細胞骨格などの小器官が観察できる空間分解能が求められる。まず、空間分解能を担保するために、(1) で確立した SLM による収差補正技術を固形がんモデルであるがんスフェロイドに適用した。微小管を蛍光色素で染色したスフェロイドの内部で収差補正を行うことで、蛍光信号の取得効率を向上させることに成功した。一方、2 光子顕微鏡を用いた固形がんの観察では、三次元的な細胞間の相互作用に関する情報を取得できるが、個々の細胞に着目して生理活性を解析する手法は発展途上である。そこで、本研究では固形がんモデルであるがんスフェロイドにおいて、細胞間相互作用や局所刺激に対する応答を可視化・解析するための手法の確立を目指した。

本研究では、がん細胞で異常に増進され、細胞外からの刺激情報の処理に関わる ERK 活性に着目した。まず、ERK の活性変化を可視化できる蛍光プローブを安定的に発現するがん細胞株を用いてスフェロイドを作製した。2 光子顕微鏡観察によって、スフェロイドを三次元的に長期間安定して撮影することに成功した。機械学習に基づく三次元の核検出・追跡プログラムを採用することで、スフェロイドを構成する 1000 個近い細胞から ERK 活性変化を自動抽出することに成功した。また、金ナノ粒子による光熱刺激によって、刺激部位を中心として、ERK 活性がスフェロイド内部を三次元的に伝搬する現象を発見した。以上のように、固形がんモデルであるがんスフェロイドにおいて、局所的な光熱刺激時の応答を、単一細胞レベルで可視化・解析する手法を確立した。本手法は、治療法適用時のスフェロイド全体の体積の減少を評価する既報とは異なり、個々の細胞の応答を評価した点に新規性がある。また、本手法は使用する蛍光プローブを変えることで、他のがん関連シグナル経路の精査にも利用できる拡張性の高さも特徴である。細胞の不均質性のがんの根治を妨げる事実を踏まえると、個々の細胞に着目して治療時の応答を解析できる本手法は、治療法の確立に大きく貢献することが期待される。