



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規2光子励起顕微鏡法を用いた表皮の恒常性維持に関する研究
Author(s)	一本嶋, 佐理
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第12633号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12633
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65620
Type	doctoral thesis
File Information	Sari_Ipponjima.pdf



平成28年度 博士論文

新規2光子励起顕微鏡法を用いた
表皮の恒常性維持に関する研究

Study on epidermal homeostasis
using novel two-photon microscopy

北海道大学 大学院情報科学研究科

生命人間情報科学専攻

脳機能工学研究室

一本嶋 佐理

目次

第 1 章	序論	1
1 - 1	本論文の概要	1
1 - 1 - 1	レーザー走査型顕微鏡	1
1 - 1 - 2	顕微鏡の空間分解能	5
1 - 1 - 3	2 光子励起顕微鏡と生体イメージング	9
1 - 1 - 4	2 光子励起顕微鏡と生体イメージングの課題	10
1 - 1 - 5	本論文の目的	11
1 - 2	本論文の構成	12
	参考文献	13
第 2 章	皮膚の生体イメージングを用いた可視化解析	15
2 - 1	背景と目的	15
2 - 1 - 1	表皮の構造	15
2 - 1 - 2	表皮の恒常性維持モデル	17
2 - 1 - 3	体の部位における表皮の違い	21
2 - 1 - 4	基底細胞の分裂	23
2 - 1 - 5	皮膚の生体イメージング	26
2 - 1 - 6	本研究の目的	28
2 - 2	材料と方法	29
2 - 2 - 1	R26H2BEGFP ヘアレスマウス	29
2 - 2 - 2	組織切片と免疫染色サンプルの作製	30
2 - 2 - 3	生体イメージングのためのセッティング	32
2 - 2 - 4	生体イメージング	33
2 - 2 - 5	データ解析のためのソフトウェア	35
2 - 2 - 6	表皮の厚さの測定	35
2 - 2 - 7	基底細胞密度の測定	35
2 - 2 - 8	細胞分裂方向の測定	36

2-2-9	分裂方向と表皮の厚さとの相関	37
2-3	実験結果	39
2-3-1	R26H2BEGFP ヘアレスマウスの樹立	39
2-3-2	背中皮膚の生体イメージング	42
2-3-3	様々な部位における皮膚の3Dイメージング	45
2-3-4	タイムラプスイメージング	48
2-3-5	分裂方向の解析	52
2-4	考察	57
2-4-1	生体イメージングにおける2光子励起顕微鏡の利点	57
2-4-2	生体イメージングにおけるヘアレスマウスの利点	59
2-4-3	観察方法について留意すべき点	60
2-4-4	4次元イメージングからの分裂方向の測定	61
2-4-5	表皮の恒常性維持モデル	63
2-4-6	分裂軸を決定する分子メカニズムについて	66
2-4-7	今後の展望	67
2-5	本研究のまとめ	68
	参考文献	69

第3章 HRP ビームによる高分解能化 75

3-1	背景と目的	75
3-1-1	超解像顕微鏡法	75
3-1-2	高次径偏光 (HRP)	82
3-1-3	HRP ビームの共焦点顕微鏡への応用	87
3-1-4	本研究の目的	93
3-2	材料と方法	95
3-2-1	光路	95
3-2-2	集光点の光強度分布のシミュレーション	99
3-2-3	ビームプロファイラによるビーム強度の観察	102
3-2-4	蛍光ビーズのサンプル作製	105

3-2-5	蛍光ビーズ画像からの分解能の測定方法	107
3-2-6	固定細胞のサンプル作製	109
3-2-7	生細胞のサンプル作製	110
3-2-8	生細胞の観察画像からの分解能の測定	112
3-3	結果	113
3-3-1	シミュレーションによる PSF の測定	113
3-3-2	ビーズサンプルの観察	114
3-3-3	固定細胞の観察	122
3-3-4	生細胞の観察	125
3-4	考察	128
3-4-1	シミュレーション結果と実測の違い	128
3-4-2	HRP ビームのサイドローブについて	129
3-4-3	ガラス-水界面における HRP ビームの効果	130
3-4-4	超解像顕微鏡と HRP ビームの比較	132
3-4-5	HRP ビームの被写界深度の深さについて	133
3-4-6	今後の展望	134
3-5	本研究のまとめ	135
	参考文献	136
第4章 本論文の結論と今後の展望		139
	参考文献	143
	謝辞	144
	研究業績	146

第 1 章 序論

1 - 1 本論文の概要

1 - 1 - 1 レーザー走査型顕微鏡

光学顕微鏡は、これまで多くの生命現象の理解に貢献してきており、生物学の研究に必要不可欠なツールである。光学顕微鏡技術の応用範囲は、単なる形態・構造の観察に止まらず、近年の機能性プローブの技術開発の進展などによって、細胞や分子の機能をも可視化することができるようになっており、光学顕微鏡の重要性は、ますます高まっている。レーザー走査型蛍光顕微鏡は、対物レンズで集光したビームスポットを走査し、試料中の蛍光分子の分布を画像化するという作動原理の顕微鏡である（図 1 - 1）。この時、試料から特定の断面だけを光学的に切り出して観察可能であり、更にコンピュータによって 3 次元的に再構築された画像を得ることもできる。

レーザー走査型蛍光顕微鏡の中で、医学・生物学の研究に最もよく使われているのは共焦点顕微鏡である。共焦点顕微鏡では、対物レンズの焦点外からの蛍光をディテクターの前にある共焦点ピンホールにより取り除くことができる。通常の共焦点顕微鏡では、第一電子励起状態への励起が 1 個の光子の吸収により起こる 1 光子励起過程を利用する。これに対し、2 光子励起顕微鏡は 1 光子励起

のときの約 2 倍の波長の 2 個の光子の同時吸収により起こる 2 光子励起過程を利用する顕微鏡であり（図 1 – 2）、近年ではこの 2 光子励起顕微鏡が生体観察などに利用されるようになった（Denk *et al.*, 1990; Cahalan *et al.*, 2003; Helmchen and Denk, 2005; Molitoris and Sandoval, 2005; Rompolas *et al.*, 2012）。一方で、2 光子励起過程が生じる確率は低く、また、2 光子励起過程により吸収される光子数は励起光強度の 2 乗に比例するため、2 光子励起顕微鏡を使用するには時間的・空間的に光子密度を高める必要がある（Takahashi *et al.*, 1995; Zipfel *et al.*, 2003b）。時間的に光子密度を高めるためには、主に超短パルスレーザーを使用し、瞬間的な光子密度を高くする。この励起光強度 $I(t)$ の 2 乗の平均は、以下の(1.1)式で表される。

$$\langle I(t)^2 \rangle = \frac{g_p}{R\tau} \langle I(t) \rangle^2 \quad \cdot \cdot \cdot \cdot (1.1)$$

g_p : レーザーのパルスの形に依存する係数（ガウシアンの場合 0.66）

R : パルスの繰り返し周波数（pulses/sec）

τ : パルス幅（FWHM）

例えば、 $\tau = 100$ fs、 $R = 80$ MHz の場合、同じ平均強度を持つ CW レーザーと比べて、パルスレーザーでは強度の 2 乗値は約 10^5 倍となる。このように、パルスレーザーにすることによって、時間的に光子密度を高めることは非常に重要である。また、空間的に光子密度を高めるために、高 NA の対物レンズを使

用する必要がある。これらの組み合わせによって、対物レンズの焦点付近でのみ 2 光子励起が起こり、蛍光を発する。このため、2 光子励起顕微鏡では、共焦点ピンホールが不要となり、検出器を対物レンズ位置に設置できるので、試料中で散乱してしまった蛍光も取得できるようになる（NDD：Non-Descanned Detector）。更に、2 光子励起顕微鏡は、第二高調波発生（SHG：Second Harmonic Generation）の観察も可能である（図 1 - 2）。SHG は非線形光学現象の 1 つであり、異方性を持つ構造にレーザーを照射すると励起波長の 2 分の 1 の波長（2 倍の周波数成分）をもつ光が放出される（図 1 - 2）。生物サンプルの中では、線維の配向がそろっているコラーゲン線維や筋肉繊維が効率よく SHG 光を放出する（Zipfel *et al.*, 2003a）。

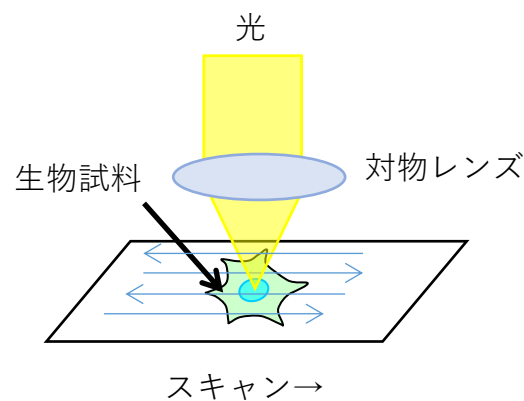
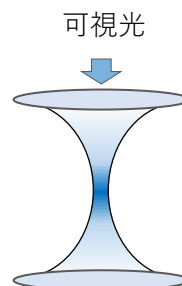
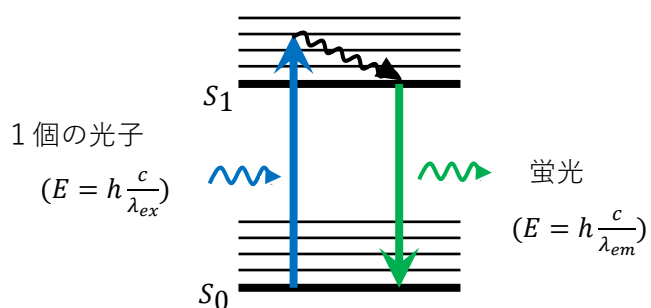


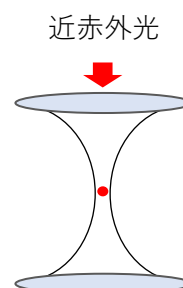
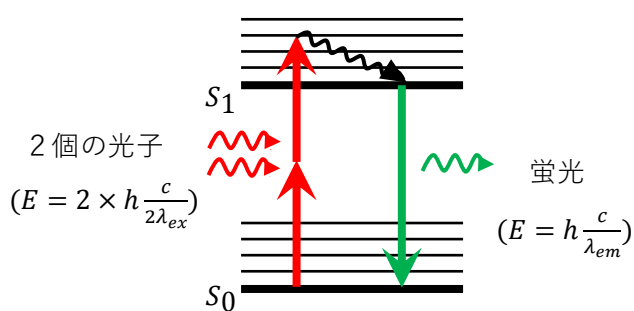
図 1 - 1 レーザー走査型顕微鏡の概略図

対物レンズで絞った集光スポットを走査し、それぞれの位置（ピクセル）における蛍光分子が放出した蛍光をディテクターにより取得する。ディテクターにより得られた蛍光強度をコンピュータで 2 次元に再構成することで、画像を得る。

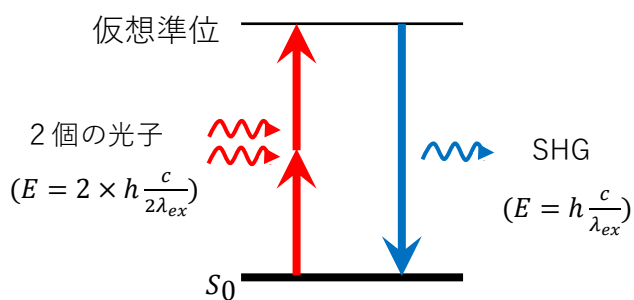
< 1 光子励起の場合 >



< 2 光子励起の場合 >



< SHG の場合 >



S_0 : 基底状態
 S_1 : 第一電子励起準位
 ——— 振動準位

h : プランク定数
 c : 真空中における光速
 λ_{ex} : 励起波長
 λ_{em} : 蛍光波長

図 1 - 2 1 光子励起と 2 光子励起の違い

1 - 1 - 2 顕微鏡の空間分解能

レーザー走査型顕微鏡の分解能は、対物レンズで集光したビームスポットの大きさに依存し、この大きさが小さいほど細かい構造を観察することができる。このビームスポットは、点像分布関数（PSF, point spread function）として表され、これが顕微鏡の分解能を決定付ける要因となる。顕微鏡がもつ分解能よりも、細かい構造を持つサンプルを観察すると、得られる画像はサンプルそのものからボケが生じてしまう。この画像は計算によって求めることができ、原像と PSF の畳み込み積分として表される（図 1 - 3）。このように、顕微鏡システムを持つ PSF を知ることはサンプルを観察する上で重要であるが、直接 PSF を測定することは困難であるため、実際は顕微鏡で無限小と仮定できる程度の小さな蛍光ビーズの画像を得ることによって、PSF を擬似的に求める場合が多い。

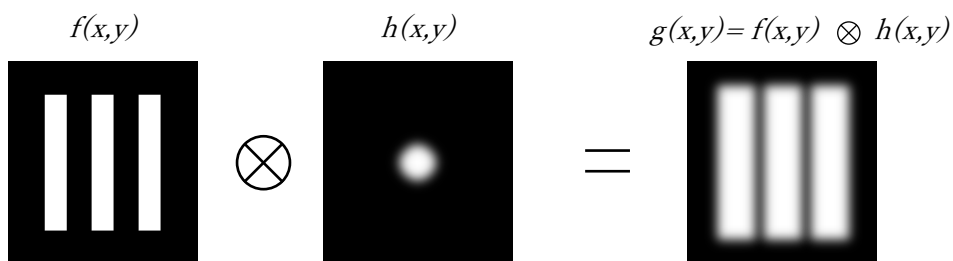


図 1 - 3 PSF と得られる画像との関係

サンプルそのもののもつ構造を示す関数を $f(x,y)$ とし、PSF を $h(x,y)$ とすると、得られる画像は $f(x,y)$ と $h(x,y)$ との畳み込み積分により得られる $g(x,y)$ であらわされる。

顕微鏡の空間分解能の定義には複数あるが、代表的な定義としては「2つの点が“2つの点”として分離して観察される最短の距離」がある（図1－4）。レイリーの分解能では、一方の点像の強度分布の最大になる中心位置が他方の像の強度分布のエアリーディスクの第一極小半径と一致するとき、2つの点像が2つに見える限界であるとした。光がレンズにより集光したときの点像の強度分布は、図1－5に示したような円形開口によるフラウンホーファー回折より、(1.2)式に示すようになる(高橋友刀, 1997; Hecht, 2003)。

$$I(q) = I(0) \left[\frac{2J_1\left(\frac{kaq}{R}\right)}{\frac{kaq}{R}} \right]^2 \cdot \cdot \cdot \cdot (1.2)$$

I は、観測面の光強度、 R は観測面に集光するレンズの焦点距離、 a は開口の半径、 k は波数を示す。また、(第1種の) m 次ベッセル関数は、

$$J_m(u) = \frac{i^{-m}}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{i(mv+u \cos v)} dv \cdot \cdot \cdot \cdot (1.3)$$

のように表すことができる。(1.2)式、(1.3)式より像面上でのエアリーディスクの第1極小半径 q_{airy} を求めると、(1.4)式に示すようになる。

$$q_{\text{airy}} = \frac{1.22\lambda f}{D} = 1.22F\lambda \cdot \cdot \cdot \cdot (1.4)$$

λ は励起波長で、 F は F ナンバーを示す。 D は円形開口の直径を示す。

q_0 を識別できる2点間の距離と定義するとレイリーの分解能は、(1.5)式で表すことができる。

$$q_0 = q_{\text{airy}} = 1.22F\lambda = 1.22\left(\frac{1}{2NA}\right)\lambda = \frac{0.61\lambda}{NA} \cdot \cdot \cdot \cdot (1.5)$$

NA : 対物レンズの開口数

$NA = n \sin \theta$

n : 屈折率

θ : 集光角

レーザー走査型蛍光顕微鏡の空間分解能の評価法としては、PSFを求めるときと同様に、分解能以下の大きさの蛍光ビーズを観察しその蛍光ビーズ像の強度分布の半値全幅で評価するという方法が一般的である。本論文中における空間分解能の評価も、蛍光ビーズを用いてその観察像から強度分布を求め、半値全幅により評価した。

この強度分布を理論的に求めるためには、フラウンホーファー回折などのスカラー回折理論を用いて集光点における強度分布を計算する場合が多い。しかし、スカラー回折理論では偏光を無視して計算を行うため、偏光を考慮する必要がある場合にはベクトル回折理論を用いなければならない。また、結像光学系の開口数が非常に大きい場合などでは、スカラー回折理論が破綻するため、スカラービームにおいてもベクトル回折理論を用いて計算する必要がある(渋谷真人、大木裕史, 2005)。

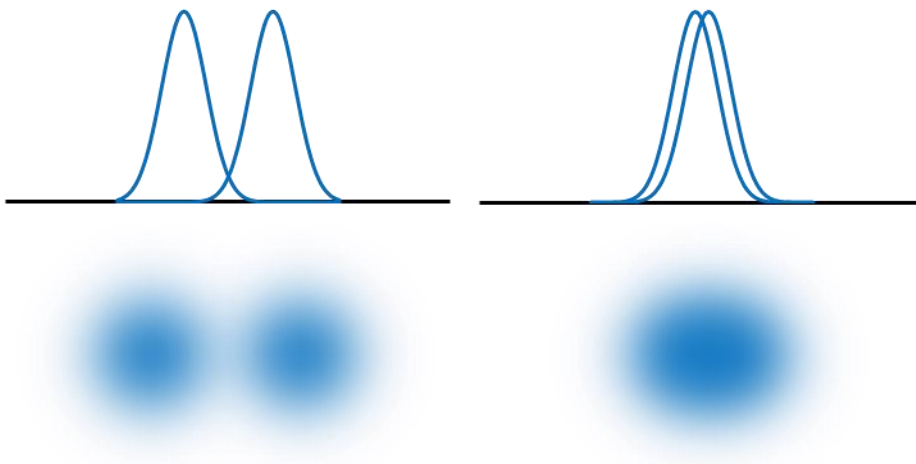


図 1 - 4 2つの点が分離できる場合（左）と分離できない場合（右）

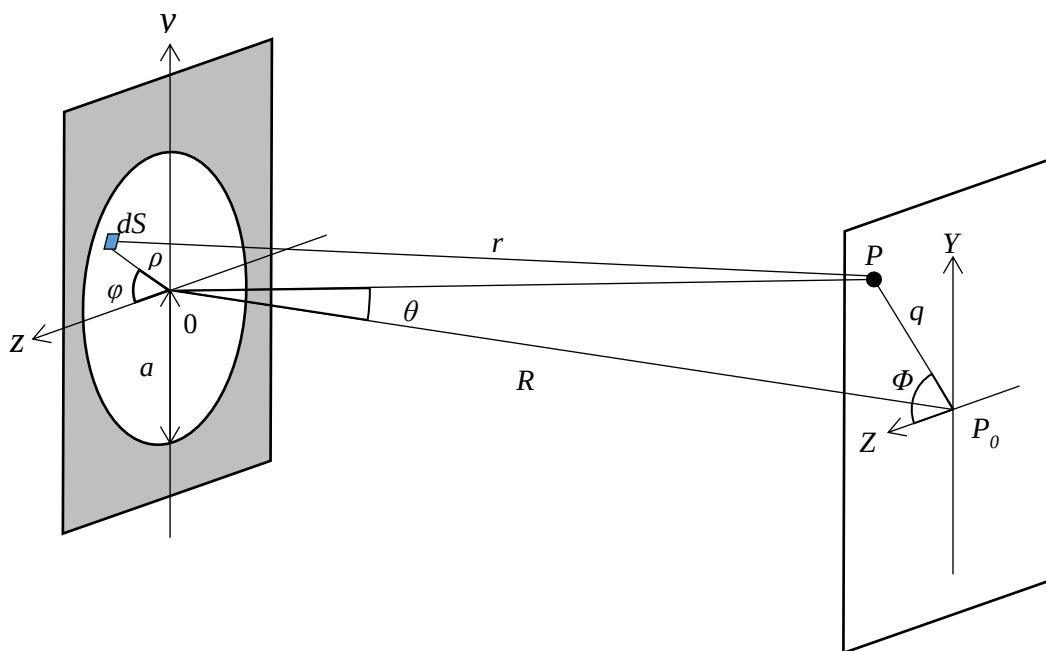


図 1 - 5 円形開口によるフラウンホーファー回折

1 - 1 - 3 2光子励起顕微鏡と生体イメージング

2光子励起顕微鏡の励起光は、「生体の窓」呼ばれる生体内での光透過性のよい波長域を利用する(図1-6)。また、散乱は長波長であるほど起こりにくい。これらの理由から、共焦点顕微鏡よりも2光子励起顕微鏡の方が、生体組織の深部を観察するのに適している。また、“1-1-1 レーザ走査型顕微鏡”で述べたように2光子励起の局所性から、焦点外における熱発生や褪色の問題を避けることができ、共焦点顕微鏡よりも低侵襲である。更に、SHG光を取得することができるため、無染色でコラーゲン線維や筋線維を可視化できる(Chen *et al.*, 2012)。また、このように、2光子励起顕微鏡は生きた個体におけるイメージング(生体イメージング)を実施するのに適した顕微鏡であると言える。

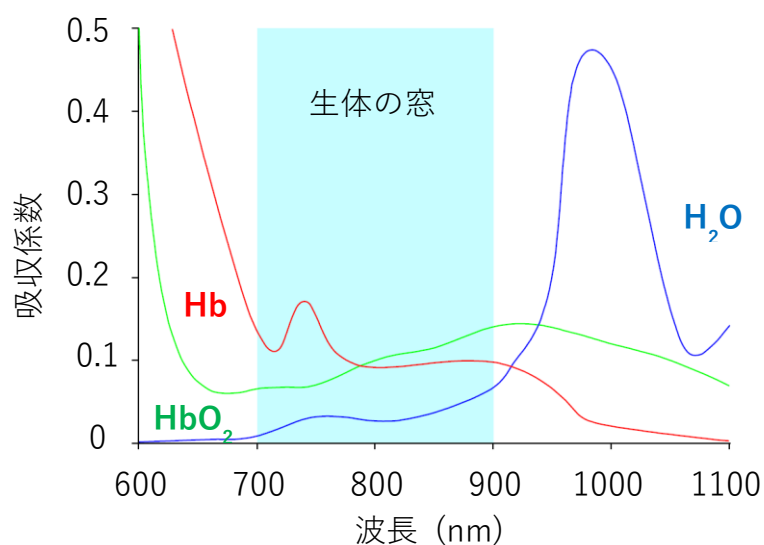


図1-6 生体の窓

Phan and Bullen, 2010 を参考にした。

1 - 1 - 4 2 光子励起顕微鏡と生体イメージングの課題

生体イメージングを実施するためには、いくつかの課題が発生する。例えば、小動物を観察する場合、心拍や呼吸などによる体動を抑えることは重要である。しかし、押さえつけすぎると、観察部位に悪影響を及ぼし、正しい結果が得られない可能性がある。また、侵襲的に生体イメージングを行う場合は、その影響について考慮する必要がある。従って、適切な観察方法を確立することは生体イメージングを行う上で重要である。一方で、観察するための動物を用意するためには、時間がかかる場合がある。例えば、観察したいタンパク質などがラベルされているマウスを探し、入手しなければならない。目的のマウスが入手できない場合は、自身で遺伝子組み換えマウスを作製しなければならない。最近ではゲノム編集技術により遺伝子組み換えマウスの作製に前ほど時間がかからなくなったが、それでも数ヶ月はかかるだろう。また、2光子励起顕微鏡それ自体にも課題はある。共焦点顕微鏡と比較すると、励起光により長波長のレーザーを用いるため空間分解能が悪くなるといった欠点を有する。

1 - 1 - 5 本論文の目的

2光子励起顕微鏡は様々な臓器の生体イメージングに応用されているが、本博士論文では、1つのアプリケーションとして、2光子励起顕微鏡をマウスの皮膚に適用し、生体イメージング法の確立を目指した。更に、2光子励起顕微鏡の空間分解能が悪いという欠点を克服するため、2光子励起顕微鏡において空間分解能の向上を目指した。

1－2 本論文の構成

「第1章 序論」では、研究の背景・目的について記述した。「第2章 皮膚の生体イメージングを用いた3次元可視化解析」では、既存の2光子励起顕微鏡を用いて、生きたマウスの様々な部位の皮膚を観察する方法を樹立し、その方法を用いて得られた結果について述べる。「第3章 HRP ビームによる高分解能化」では、“高次径偏光(HRP)ビーム”を2光子励起顕微鏡に適用した結果について述べる。「第4章 本論文の結論と今後の展望」においては、本博士論文における研究全体の結論と、今後の展開を述べる。また、本博士論文において助言助力を頂いた方々への謝辞、著者の研究業績を記載した（図1－7）。

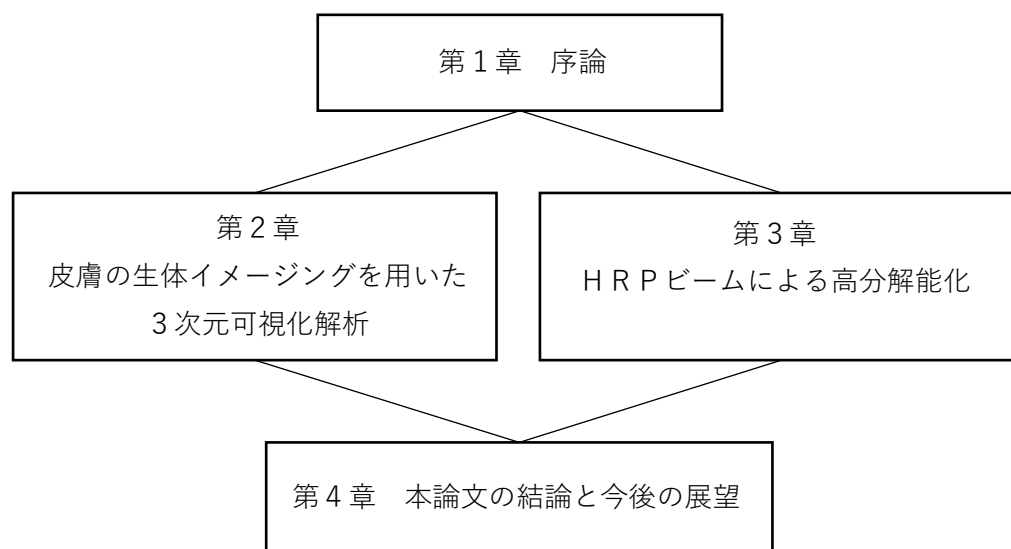


図1－7 本博士論文の構成

参考文献

Cahalan, M.D., Parker, I., Wei, S.H., and Miller, M.J. (2003). Real-time imaging of lymphocytes in vivo. *Current Opinion in Immunology* 15, 372-377.

Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., and Campagnola, P.J. (2012). Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat Protoc* 7, 654-669.

Denk, W., Strickler, J.H., and Webb, W.W. (1990). Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* 248, 73-76.

Hecht, H. (2003). ヘクト光学Ⅱ. 丸善株式会社.

Helmchen, F., and Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth* 2, 932-940.

Molitoris, B.A., and Sandoval, R.M. (2005). Intravital multiphoton microscopy of dynamic renal processes. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 288, F1084-F1089.

Phan, T.G., and Bullen, A. (2010). Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: faster, brighter, deeper. *Immunol Cell Biol* 88, 438-444.

Rompolas, P., Deschene, E.R., Zito, G., Gonzalez, D.G., Saotome, I., Haberman, A.M., and Greco, V. (2012). Live imaging of stem cell and progeny behaviour in physiological hair-follicle regeneration. *Nature* 487, 496-499.

Takahashi, Y., Ishikawa, O., Okada, K., Ohnishi, K., and Miyachi, Y. (1995). Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans in chronically ultraviolet light-irradiated hairless mice. *J Dermatol Sci* 10, 139-144.

Zipfel, W.R., Williams, R.M., Christie, R., Nikitin, A.Y., Hyman, B.T., and

Webb, W.W. (2003a). Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7075-7080.

Zipfel, W.R., Williams, R.M., and Webb, W.W. (2003b). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* *21*, 1369-1377.

渋谷真人、大木裕史. (2005). 回折と結像の光学. 朝倉書店.

高橋友刀. (1997). レンズ設計. 東海大学出版社.

第2章 皮膚の生体イメージングを 用いた3次元可視化解析

2-1 背景と目的

2-1-1 表皮の構造

皮膚は、全身を覆って生体の外と内を区切る、最大の器官である。皮膚は外からの様々な異物の進入を阻んだり物理化学的な刺激から生体を守るだけではなく、水分の損失や透過を防いだり、体温を調節したり、更に感覚器としての役割を果たすなど、生きる上で必要不可欠な様々な機能を持つ。皮膚は、主に表皮、真皮、皮下組織から成るが、生体保持には表皮が最も重要な役割を担う(清水宏, 2011)。

表皮は層構造になっており、下側から基底層、有棘層、顆粒層、角質層となっている(図2-1)(Simpson *et al.*, 2011; 清水宏, 2011)。基底層は、基底膜に接する細胞(基底細胞)から成る1層の細胞層である。また、基底層には増殖能を持つ細胞が存在するが、有棘層以降の層には増殖能を持つ細胞は存在しないと考えられている。有棘層上部から顆粒層にかけては細胞内にセラミドなどを含む小体を有する。顆粒細胞は角化する直前にその小体を細胞外に放出するこ

とで、角化や保湿に関与する。脱核して、角化した（死んだ）細胞は1番外側のバリアとなり、そのうち垢となって剥がれ落ちて行く。従って、基底層で生まれた細胞は、性質を変えながらそれぞれの層で異なる役割を果たし、角化に向かっていく。

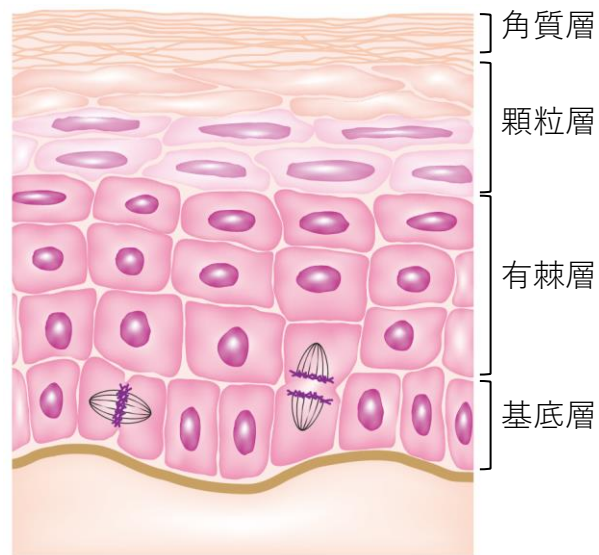


図2－1 表皮の構造

Simpson *et al.*, 2011 を参考。

2-1-2 表皮の恒常性維持モデル

表皮は、正常にターンオーバーすることで、恒常性が維持されているが、継続的な刺激や老化では皮膚は不可逆的に変化していく。例えば、細胞周期の遅延や、異型な幹細胞の出現が起これ、ターンオーバーのメカニズムが破綻する。従って、このターンオーバーのメカニズム、つまり恒常性維持のメカニズムを理解することは非常に重要である。

皮膚における、最もよく知られている幹細胞は、毛包のバルジという領域に存在する毛包幹細胞である。この幹細胞が活発になるのは毛周期の成長期だけではない。実は、皮膚が傷ついたときなどの緊急時に、表皮や毛包、皮脂腺を構成する各々の細胞に分化することができる前駆細胞を供給する(Ito *et al.*, 2005)。一方で、この毛包幹細胞は正常な表皮の維持には関わっていないことは実証されている(Ito *et al.*, 2005; Page *et al.*, 2013)。表皮のようなターンオーバーによって細胞が常に更新されていく組織では幹細胞が存在すると考えられているが、表皮の維持に関わる幹細胞のマーカーは同定されておらず、表皮の恒常性維持のメカニズムはまだ不明な点が多い。とはいうものの、正常な表皮には分裂頻度が異なる増殖細胞が存在することが報告されていたりと、多くの研究において、幹細胞等を含む2種類以上の増殖細胞が存在することが考えられており、それ

を元にした恒常性維持モデルや仮説が提唱されてきた。1970 年代に表皮の恒常性維持のメカニズムに関する仮説、EPU (Epidermal Unit) 仮説が報告された (Potten, 1974) (図 2 - 2)。この仮説によると、表皮の更新単位は各角化細胞ごとで区切られており、角化細胞直下の 10 個程度の基底細胞のうち中央の 1 個が表皮幹細胞であり、残りが TA(transit amplifying)細胞であるとされる (Potten, 1974)。この TA 細胞は、分裂可能回数が決まっており、それに達したら分化するというシステムである。しかし、遺伝子操作技術の発展に伴って、表皮の構成単位 EPU は存在しないというような、EPU 仮説に矛盾する結果が徐々に報告された (Jones *et al.*, 2007)。そして、2007 年、2010 年の細胞系譜解析法を用いた論文によって、EPU 仮説がほとんど完全に否定された (Clayton *et al.*, 2007; Doupé *et al.*, 2010)。彼等の恒常性維持モデルは、数日～1 年くらいの長期間に渡って行われた細胞系譜解析法を用いた実験結果と、数値計算によって得られている。その結果、分裂可能回数が決まっている TA 細胞という概念は彼らの結果とは矛盾した結果となり、新たな確率的に対称・非対称分裂をする CP (committed progenitor) 細胞が提唱された。このモデルでは、図 2 - 3 に示すように、CP 細胞による 3 通りの分裂様式が存在する。これは、CP 細胞が 2 つの CP 細胞を生む場合、2 つの増殖できない細胞を生む場合、1 つの CP 細胞と 1 つの増殖できない細胞を生む場合に分けて考えられている。このモデルは、耳と

尻尾の表皮において示されており、どの表皮においても共通であると考えられている。また、最近では細胞周期の頻度の異なる幹細胞が異なる領域に存在することも報告されていたり (Sada *et al.*, 2016)、表皮の維持メカニズムについては様々なモデルが提唱されている。

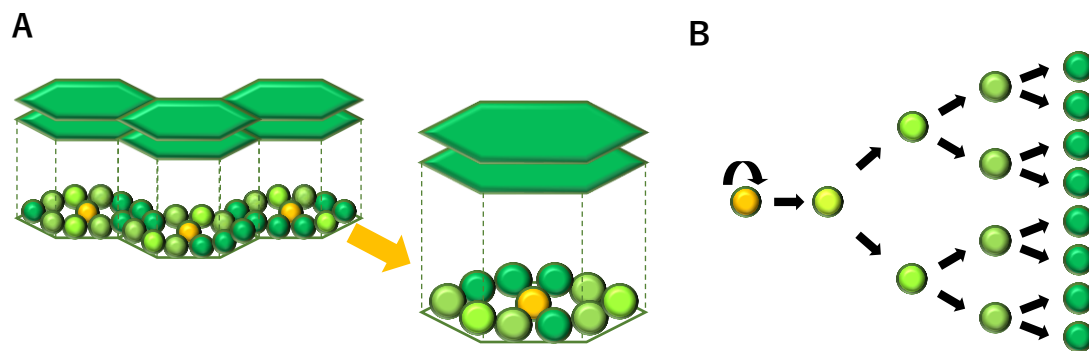


図 2 - 2 EPU 仮説

(A) EPU 仮説において定義されている Epidermal Unit の概略図を示す (Jones and Simons, 2008)。丸い形をしたものは基底細胞であり、各構成単位の真ん中に黄色で示したような幹細胞が存在し、その周囲に黄緑色で示された TA 細胞が存在する。(B) 幹細胞 (黄色) は自己複製でき、TA 細胞の産生も行う。TA 細胞は、分裂可能回数に到達したら分裂できなくなり (緑色の細胞) 分化して上に移動していく。

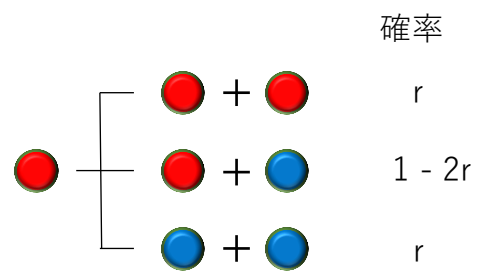


図 2 - 3 新たな表皮恒常性維持モデル

赤色が CP 細胞。青色が分裂することができない細胞 (postmitotic cell)。 r は対称分裂する確率を示す (Clayton *et al.*, 2007; Jones and Simons, 2008; Doupé *et al.*, 2010)。

2-1-3 体の部位における表皮の違い

前節で示されたように表皮の基底細胞に着目することによる恒常性維持モデルは提唱されているが、それらは部位に依存しない共通のメカニズムだと考えられており、部位間の皮膚での違いについてはほとんど言及されていない。確かに、全ての領域に共通したメカニズムを明らかにすることは非常に重要であるが、そのためには体の部位ごとの違いを調べ、共通な部分と異なる部分を明確に区別する必要がある。実際、部位によって、構造などは大きく異なり、発現している分子も異なる場合がある。マウスでは、背中と耳の表皮は構造的に似ており、3～5層から成る非常に薄い表皮である(Potten, 1975; Porter *et al.*, 1998)。一方、足の裏の表皮においては、背中と耳の表皮よりも厚く角質層も厚くなっている。尻尾の表皮も足の裏と同じくらい厚いが、特徴的な構造を持ち、2種類の scale (「鱗」) 領域と interscale 領域と呼ばれる部位からなる(図 2-4) (Gomez *et al.*, 2013)。それぞれの部位における表皮の構造は、アダルトマウスでは基本的に維持されている。また、それぞれの部位では、発現している分子が異なる場合がある。例えば、ケラチン 2 は、背中の表皮では発現しないが、耳では発現している(Fischer *et al.*, 2014)。一方、足の裏の表皮には発現する部位と発現しない部位が存在し、尻尾でも interscale 領域では発現するが、scale 領域では発現

しない(Fischer *et al.*, 2014)。このように、それぞれの部位では厚さも分子の発現パターンも異なることから、それぞれの部位での恒常性維持のメカニズムには異なる部分があると考えられるが、どのように異なるのかについては不明な点が多い。

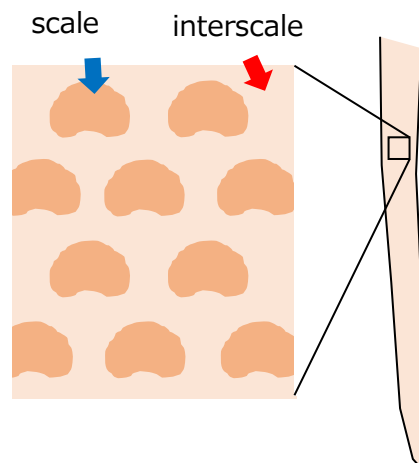


図 2 - 4 尻尾の scale 領域と interscale 領域

scale 領域は互い違いになるように配置されており、interscale 領域は scale 領域の間の領域をさす。interscale 領域では通常の表皮と同様に角質層で細胞が脱核するが、scale 慮域では脱核せず角質層で核の形が維持されている。

2-1-4 基底細胞の分裂

基底細胞の分裂頻度は、体の部位によって大きく異なり、厚い表皮ほど基底細胞の分裂頻度が高い傾向にあることが報告されている (Porter *et al.*, 1998)。また、分裂様式を調べる上で、分裂頻度だけではなく分裂方向も重要である可能性がある。特に発生期において、様々な細胞種で分裂方向は運命決定に大きく関与することが知られている。例えば、大脳皮質の神経上皮細胞、網膜の細胞、心外膜細胞、血管上皮細胞などがある (Cayouette and Raff, 2003; Zeng *et al.*, 2007; Konno *et al.*, 2008; Siller and Doe, 2009; Wu *et al.*, 2010)。発生期の表皮においても分裂方向は細胞運命決定に関わっている (Lechler and Fuchs, 2005)。基底細胞が基底膜に対し平行に分裂すると 2 つの基底細胞が生まれるのに対し、垂直方向の分裂は 1 つの基底細胞と、1 つの基底上層の細胞 (つまり基底膜に接しない基底層の上層に位置する細胞) が生まれる (Kulukian and Fuchs, 2013)。この基底上層の細胞は、分化する方向に向かっていき増殖能が失われると考えられる (図 2-5)。更に興味深いことに、マウスの胎生期において表皮が完成するまでの間、基底細胞の分裂方向は時期依存的に厳密に制御される (Lechler and Fuchs, 2005; Kulukian and Fuchs, 2013; Williams *et al.*, 2014; Dainichi *et al.*, 2016)。胎生 12.5 - 13.5 日目では、平行分裂によってモノレイヤーが作られ、胎

生 14.5 - 15.5 日目では平行分裂、ななめ方向の分裂、垂直方向の分裂がランダムに起きる。胎生期 16.5 - 17.5 日目では平行分裂、もしくは垂直分裂の 2 峰性の分布になる（図 2 - 6）。このように分裂方向を時期依存的に制御することにより成熟した表皮構造が形成される。一方で、アダルトマウスにおいて、細胞分裂の方向が表皮の構造の維持に関与しているかどうかは明らかになっていない。更に、細胞分裂の方向が部位に依存するののかもほとんど調べられていない。

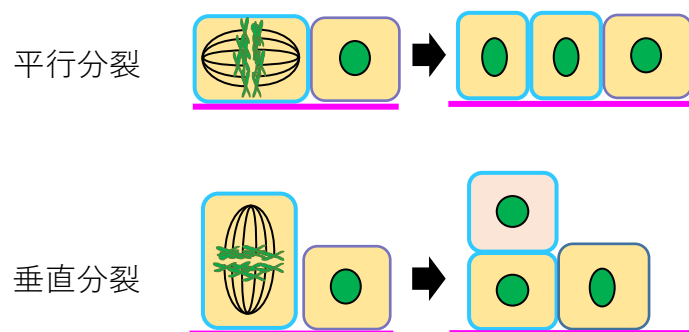


図 2 - 5 平行分裂と垂直分裂

表皮では、基底膜（マゼンタ）に対して平行に分裂（平行分裂）すると、2つの基底細胞が生まれる。一方で、垂直方向の分裂（垂直分裂）では1つの基底細胞と1つの基底上層の細胞が生まれる。

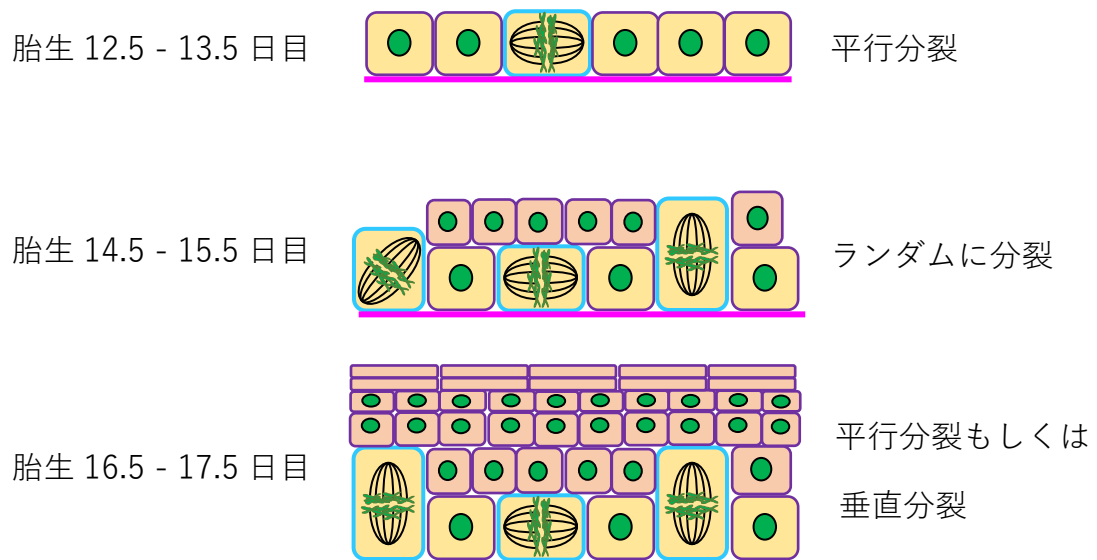


図 2 - 6 胎生期における表皮の発達の際の分裂方向

Lechler and Fuchs, 2005; Williams *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2014 を参照した。

2-1-5 皮膚の生体イメージング

ヒトの皮膚の内部構造を非侵襲的に測定する方法はいくつか開発されている。そのなかでも、OCT (Optical Coherence Tomography)は近赤外光を用いた散乱光より画像を構築する断層撮影法であり、深さ方向の分解能も数 μm 程度と高く、波長が長いので深部(1mm程度)まで観察可能である(宮地良樹、松永佳世子、古川福実、宇津木龍一, 2009)。また、OCTは眼科などで臨床応用もされており、皮膚においては角質層や表皮の厚さの測定などに利用できる。一方で、2光子励起顕微鏡は、OCTよりも価格が高く、簡便に利用できないため臨床へはほとんど普及していないが、3次元的に細胞レベルで組織深部を観察可能であるというメリットがある。また、2光子励起顕微鏡法では、無染色でも自家蛍光や真皮コラーゲンからの第二高調波発生(SHG)光を取得することで、細胞の形、皮膚の構造自体を可視化することが可能である。更に、近年では蛍光プローブや遺伝子組み換え技術の発展に伴って、生きたマウス個体を用いた皮膚の生体イメージングを用いた可視化解析が徐々に増えている(Ra *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Rompolas *et al.*, 2012; Aoki *et al.*, 2013; Kilarski *et al.*, 2013; Kabashima and Egawa, 2014; Stringari *et al.*, 2015)。特に、真皮で免疫細胞が動く様子などを捉えるために皮膚の生体イメージングを利用している報告が多い。

マウス皮膚の生体イメージングは、基本的には耳の皮膚を使った報告が多い。耳の皮膚は、心臓や肺から離れた位置にあるため、観察時に心拍や呼吸などの影響を受けにくく、更に毛が少ないことや表皮の厚さが薄いといったことから観察しやすい部位である。また、耳の皮膚観察のためのプロトコルも報告されている (Li *et al.*, 2012)。一方で、手や足の裏、尻尾の皮膚についても、耳と同様に体動の影響を受けにくく、毛も生えていないが、表皮の厚さが厚いことなどが理由で報告は少ない。背中の皮膚は、多くの皮膚科学の研究で用いられる一般的な部位であるが、背中の皮膚の生体イメージングの際は直接体動による影響を受けるため非侵襲な生体イメージングはほとんど行われていない。従って、様々な部位の表皮において生体イメージングを実施するためには、それぞれの部位における問題点を解決する必要がある。

2-1-6 本研究の目的

表皮は体の部位によって構造や厚さが異なるが、それぞれの部位で厚さを維持するメカニズムについては明らかになっていない点が多い。また、皮膚は *in vivo* イメージングに適しているが、それは主に耳の皮膚での話であり、その他の部位での報告はほとんどない。そこで、本研究では、様々な部位の表皮（背中、耳、足の裏、尻尾）を非侵襲的に長時間観察するための、新規2光子励起顕微鏡法を樹立することを目的とする。更に、その方法を利用して、部位間での比較を行い、厚さの異なる表皮間における恒常性維持機構の違いを考察することを目指す。

2-2 材料と方法

2-2-1 R26H2BEGFP ヘアレスマウス

本研究では、生きたマウス表皮の細胞分裂を調べるため、ROSA26プロモーターの下流でヒストン2B(H2B)と緑色蛍光タンパク質(EGFP)の融合タンパク質(H2BEGFP)を発現する、R26H2BEGFPマウス (Kurotaki *et al.*, 2007) (基礎生物学研究所の藤森俊彦教授より提供) を利用した。しかし、マウスの体毛や色素は、顕微鏡での観察時に妨げとなることから、皮膚の研究に良く使われるアルビノで体毛がないHR-1/Hosマウス (星野試験動物飼育所) と5回以上交配を繰り返し、R26H2BEGFPヘアレスマウスを樹立した (図2-7)。その後は、兄弟交配を行って維持した。本研究では、8-12週齢の♂マウスを利用した。これらのマウスは、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターのSPF環境の飼育室で繁殖・維持・管理した。実験で利用した全てのマウスは、頸椎脱臼により安楽死させた。

尚、本研究は「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」と「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に従い実施した。動物実験室の設置申請 (承認番号第21(25)号、第22(12)号)、マウスを用いた動物実験の計画 (承認番号12-0111)

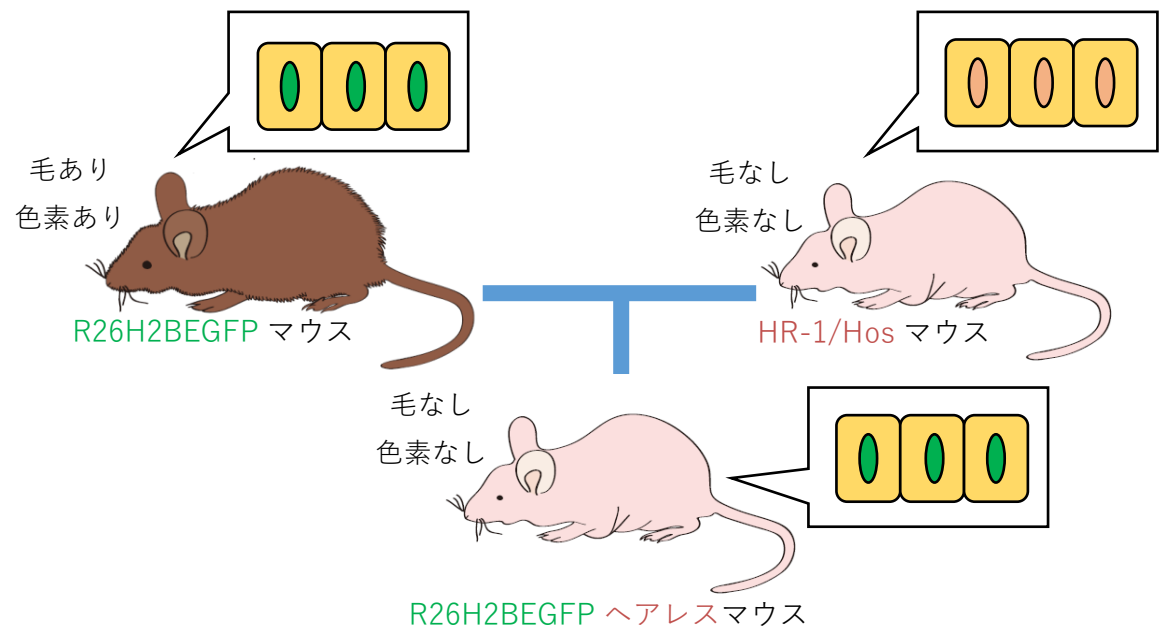


図 2-7 R26H2BEGFP ヘアレスマウスの樹立

2-2-2 組織切片と免疫染色サンプルの作製

R26H2BEGFP ヘアレスマウスから背中、耳、足の裏、尻尾の皮膚を採取し、ろ紙に張り、それを 4%PFA(formaldehyde) in PBS(phosphate buffered saline)で 2-3 日固定した。固定した皮膚組織は、10%スクロース液に 4~5 時間漬け、その後、30%スクロース液に 1 日浸す。その後、皮膚を適切な大きさに切り、

SCEM (Leica Microsystems)の入ったクリオモルドに入れ、液体窒素で凍結させ、-80 度の冷凍庫で保管した。凍結組織はクライオスタット (Leica CM3050 S cryostat)で 10 μ m 厚にカットし、MAS コーティングされたスライドガラスに貼り付けた。組織学的な解析のために、凍結切片は、H&E 染色した。また、免疫染色のために、1 次抗体は anti-keratin 14 (K14) rabbit polyclonal antibody (Covance)を 1:1000、anti-keratin 10 (K10) mouse polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific)は 1:200 で使用した。2 次抗体は、Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse または anti-rabbit IgG antibody (Thermo Fisher Scientific)を 1:400 で使用した。核の可視化のために Hoechst33342 (Dojindo)も利用した。これらのサンプルは共焦点顕微鏡 (A1R, Nikon, Tokyo, Japan)と CFI Plan Apo VC 60XWI objective lens (Nikon)を用いて観察を行った。

H&E 染色の方法

ヘマトキシリンに 2 min 浸し、MilliQ で洗い、その後、エオジンに 2 min 浸す。そして、95%エタノールに出し入れ 10 回、100%エタノールに 5 min 浸け、レモゾールエースに 5 min 浸し、その後、再びレモゾールエースに 5 min 浸す。最後に包埋剤で封入する。

免疫染色の方法

切片を 4%PFA に 1 時間浸したあと、PBS で洗い、10mM glycine-PBS で更に洗う。次に、3%BSA-PBS でブロッキングを室温 30 min 行い、10mM glycine-PBS で洗った後、1 次抗体（1%BSA-PBS で希釈）を室温 1 時間もしくは 4 度で 1 晩浸す。その後、PBS で洗ってから、2 次抗体と Hoechst（1%BSA-PBS で希釈）を切片に滴下し、室温 1 時間で放置する。PBS で洗った後、MilliQ で包埋した。

2-2-3 生体イメージングのためのセッティング

観察時には、1.0%-2.0%のイソフルランでマウスに吸入麻酔した。観察時に使用したガラスボトムディッシュの壁は、対物レンズにぶつかるのを避けるため、超音波カッターを使って取り除いた（図 2-8）。背中の皮膚の観察のためにリング型のネオジム磁石（直径 12 mm、内径 8 mm、厚さ 1 mm、重さ 0.46 g; NR108, Nirokuseisakusyo）を使用した。また、セッティングのために、2 種類の両面テープ、両面テープ A（#04683, Konishi）、両面テープ B（#NW-K15, Nichiban）を使用した。

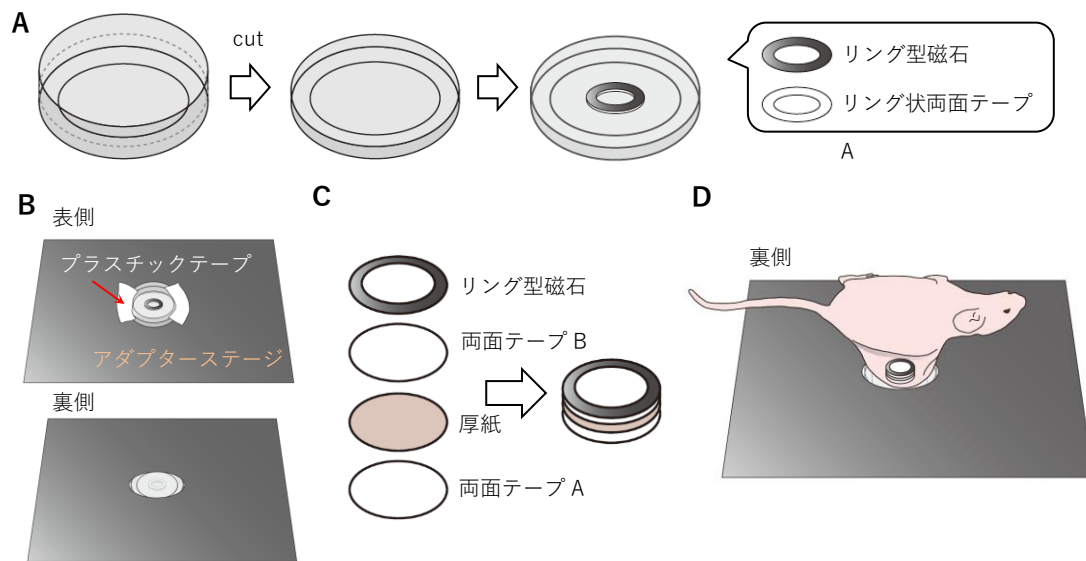


図 2-8 R26H2BEGFP ヘアレスマウスの背中皮膚の観察方法

(A) ガラスボトムディッシュの壁は、対物レンズとの衝突を避けるために切り除き、リング型磁石は、リング状両面テープ A を使って、そのガラスボトムディッシュの真ん中に置く。(B) カットしたガラスボトムディッシュは、アダプターステージの真ん中に置き、プラスチックテープで固定する。(C) 対となるもう 1 つのリング型磁石と、両面テープ B、厚紙、両面テープ A は重ねて 1 つにする。(D) 麻酔下のマウスは、逆向きにしたアダプターステージの上に置き、マウスの背中皮膚をわずかに伸ばし、MilliQ を滴下したガラスボトムディッシュのガラス部分に 2 つのリング型磁石を使って固定する。

2-2-4 生体イメージング

生体イメージングは、GaAsP デテクターを装着した A1RMP+ (Nikon) を使って行った。対物レンズは、切り替え式のレボルバーFNS2N Sliding Nosepiece (Nikon) に UPLFLN4X (N.A. 0.13, Olympus) と XLPLN25XWMP (N.A. 1.05,

Olympus) を装着し、切り替えて使用した。共焦点顕微鏡での観察の際は、励起波長 488 nm を使用し、UPLFLN4X (N.A. 0.13, Olympus) の対物レンズを用いた (図 2 - 9)。2 光子励起顕微鏡の際は、励起波長 900 nm で主に XLPLN25XWMP (N.A. 1.05, Olympus) を使用し、シグナルの取得の際は、458 nm と 560 nm のロングパスダイクロイックミラー (DM) を使って、450 nm の SHG 光と GFP の蛍光を分けて取得した (図 2 - 9)。2 光子励起による 3 次元タイムラプス観察の画像は $1,024 \times 1,024$ pixels ($0.224 \mu\text{m}/\text{pixel}$), $1\text{-}\mu\text{m}$ z-steps ($50 \mu\text{m}$ 以上の厚さ), 2 sec/frame, every 3 min で取得した。

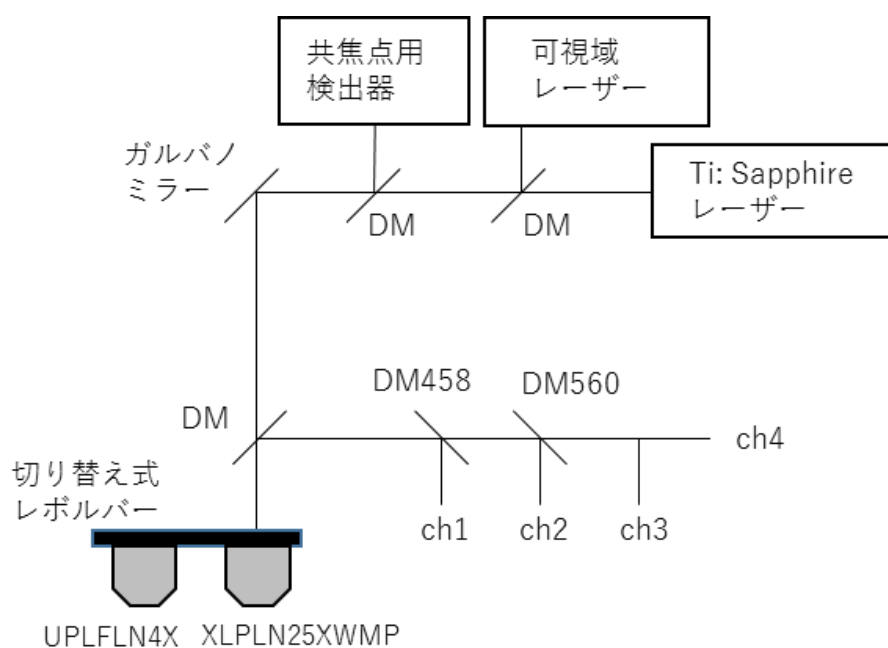


図 2 - 9 顕微鏡の光路図

2-2-5 データ解析のためのソフトウェア

画像の解析には NIS-Elements software (Nikon)を使用した。全てのタイムラプス画像は Imaris software (Oxford Instruments, Oxfordshire, UK)を使って、観察中に発生したドリフトを補正した。また、Steel-Dwass 検定には統計解析ソフト R を使用した。

2-2-6 表皮の厚さの測定

R26H2BEGFP ヘアレスマウスとその同腹の野生型マウスの H&E 染色した皮膚切片の画像から表皮の厚さ（角質層なし）と、角質層の厚さを測定し、Steel-Dwass 検定を使って比較した。更に、R26H2BEGFP ヘアレスマウスの生体イメージングから得られた 3次元画像からも表皮の厚さ（角質層なし）と、角質層の厚さを測定し、Steel-Dwass 検定を使って比較した。

2-2-7 基底細胞密度の測定

基底細胞密度は生体イメージングで取得した3次元画像から測定した。毛包を除いた一部の領域において、細胞数を数え、密度を計算した。体の各部位間での違いは、Steel-Dwass 検定を使って評価した。

2-2-8 細胞分裂方向の測定

まず最初に4時間のタイムラプス画像から、分裂した細胞を見つけ、その細胞を含む小さな領域を3次元的に切り出した画像を作製した。その後、(i)皮膚表面に対して平行な方向、(ii)基底膜に対する方向、とに分けて3次元的に分裂方向を測定した。測定したデータは、23（背中）、21（耳）、39（足の裏）、23（interscale）、20（scale）の分裂細胞である。

(i) 皮膚表面に対して平行な分裂方向の測定

各部位ごとに基準となる方向を決めた。背中、耳、尻尾は毛包の向きを基準線とし、足の裏はかかと一中指を結んだ線を基準線とした。切り出した画像において、2つに分かれた核の中心を結んだ線と、基準線との間の角度を0-90°の幅

で測定した (図 2-18)。

(ii) 基底膜に対する分裂方向

基底膜面に対する細胞分裂の方向の測定も同じ切り出し画像を用いた。分裂によって分かれた 2 つの核の中心を結ぶ線の x - y 面上における成分 (ベクトル a) が x 方向を向くように角度 θ だけ、画像を回転させる。回転させた画像から、SHG シグナルを指標にした基底膜面と、2 つの核を結んだ線との角度 ϕ_z を測定した (図 2-19)。

2-2-9 分裂方向と表皮の厚さとの相関

部位間を考慮せずに、分裂方向と表皮の厚さとの相関を調べるために、前節で測定した分裂細胞の方向のデータを用いた。詳細には、背中 ($n = 23$, マウス 7 匹)、耳 ($n = 21$, マウス 5 匹)、足の裏 ($n = 39$, マウス 6 匹)、interscale ($n = 23$, マウス 6 匹)、scale ($n = 20$, マウス 7 匹) から成り、計 126 個である。各々の分裂細胞に対する表皮の厚さは、マウス毎の平均の厚さを示す。従って、4 時間の観察において複数個の細胞分裂が観察された場合、その全ての分裂細胞は

同じ厚さを持つことになる。この分裂方向と表皮の厚さは、正規分布しないため、ノンパラメトリックな Spearman の順位相関係数を統計解析ソフト R を使って求めた。

2-3 実験結果

2-3-1 R26H2BEGFP ヘアレスマウスの樹立

R26H2BEGFP マウスは、全ての細胞の核で GFP が発現するマウス(Kurotaki *et al.*, 2007)であり、細胞の挙動を可視化するのに有用である。しかしながら、R26H2BEGFP マウスは、皮膚のイメージングの障害となる、体毛とメラニンを保有していた(Li *et al.*, 2012)。そこで、メラニンを保有しないヘアレスマウスである HR-1/Hos マウスと繰り返しバッククロスすることにより、色素がなくかつ体毛がない R26H2BEGFP マウスを樹立した（以下 R26H2BEGFP ヘアレスマウス）。この樹立した R26H2BEGFP ヘアレスマウスは、通常のヘアレスマウスと同様に、生後2週間後までは通常のマウスと同様に毛が生えるが、それ以降から脱毛が始まり、おおよそ生後3週間後には体毛が全て抜けた(Benavides *et al.*, 2009)。R26H2BEGFP ヘアレスマウスは外見上、体毛がない以外に皮膚に際立った異常は見られなかった（図2-10）。また、背中、耳、足の裏、尻尾のH&E染色した皮膚切片からは、R26H2BEGFP ヘアレスマウスと、その同腹のGFPを発現しない野生型マウスとの間に、皮膚の構造に大きな違いは見られなかった（図2-11、A-C）。更に、R26H2BEGFP ヘアレスマウスの皮膚の免疫染色画像から、K14+細胞が基底層に、K10+細胞が基底上層に適切に存在す

ることを確認した（図 2 - 1 1、D）。これらの結果から、R26H2BEGFP ヘアレ
スマウスの皮膚に異常は見られないことが確認できた。



図 2 - 1 0 R26H2BEGFP ヘアレスマウスとその同腹の WT マウス

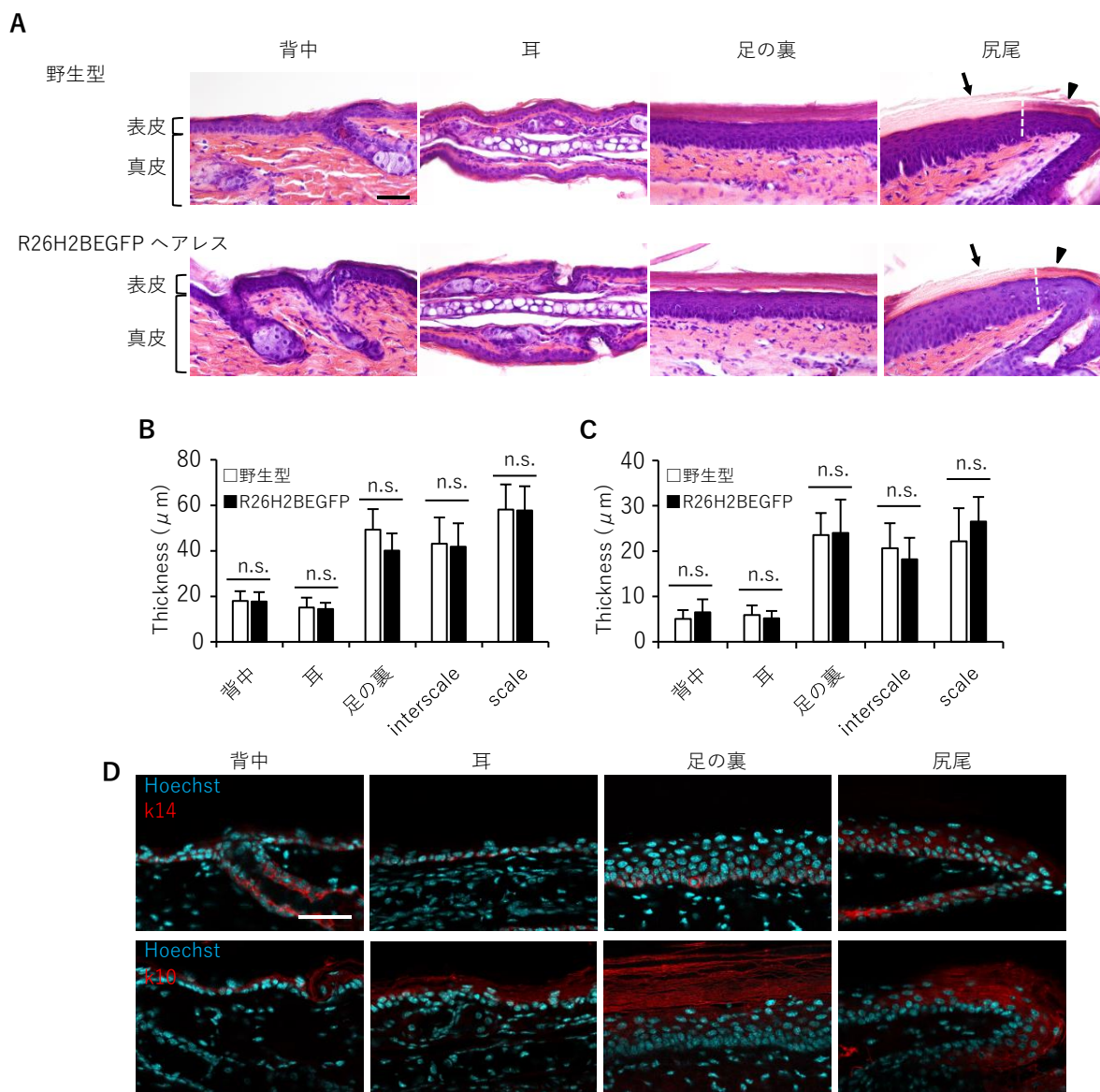


図2－11 R26H2BEGFP ヘアレスマウスの樹立

(A) H&E 染色した皮膚切片。矢印は scale 領域を示し、矢頭は interscale を示す。(B, C) H&E 染色画像から測定した各部位における、表皮(角質層以外)の厚さ B と、角質層の厚さ C。このデータは、各部位ごとに、4－5 匹のマウスから 18 点以上測定した結果。Steel-Dwass test を用いて検定を行った。エラーバーは、標準偏差を示す ($*P < 0.05$; n.s., not significant)。(D) R26H2BEGFP ヘアレスマウスの各部位ごとの皮膚切片の免疫染色画像。上の画像が K14 と Hoechst、下の画像が K10 と Hoechst の染色画像である。スケールバーは 50 μm を示す。

2-3-2 背中皮膚の生体イメージング

生きたマウスで様々な部位の表皮を比較するために、外科的、化学的処置のいらない、できるだけ非侵襲的な観察方法の樹立に取り組んだ。呼吸や心拍による体動の影響を抑えるために、麻酔下のマウスの背中皮膚をガラスボトムディッシュに対して軽く伸ばし、2つのリング型のネオジム磁石、両面テープ A、両面テープ B、厚紙を使って固定した（図 2-12）。2つのリング型磁石だけの固定だと、皮膚を挟む力が強すぎることで、リング型磁石の内側の皮膚の色が、リング型磁石の外側の場所と比べて青白くなってしまう。従って、リング型磁石の内側の皮膚の色が他の場所と変わらなくなるまで、マグネットの間に厚紙を挿入し（1～2枚）、挟む力を調節した。また、両面テープ A を使うことで、観察中の大きな視野ずれを軽減させた。

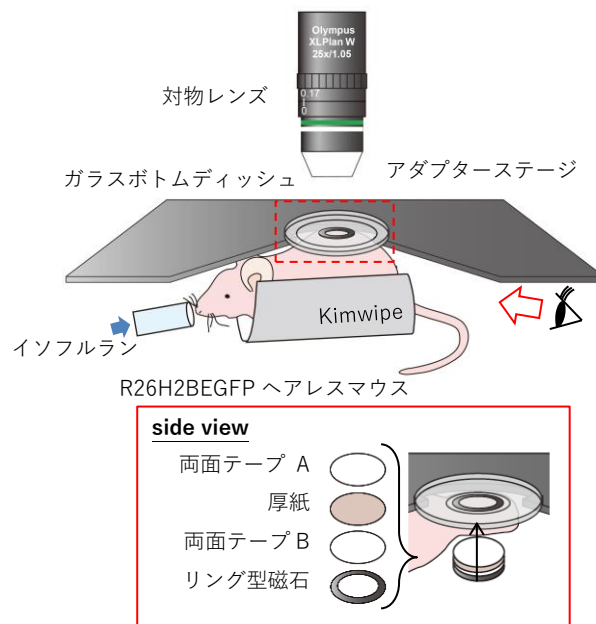


図 2 - 1 2 背中皮膚の観察方法の概略図

正立 2 光子励起顕微鏡を使った、背中皮膚の生体イメージングの概略図。赤枠は、赤点線で示された部分をその概略図の横から見た図。詳しい観察方法は、“2 - 2 材料と方法 2 - 2 - 3 生体イメージングのためのセッティング”と図 2 - 9 に記載。

このように、皮膚を最小減の力で固定する方法を用いて、健康な背中の皮膚における 3 次元構造を 2 光子励起顕微鏡で可視化することができた（図 2 - 1 3、図 2 - 1 4、A、B）。表皮の深部になるほど、核の大きさは次第に小さくなり、基底細胞密度は高くなった。基底膜に接する基底細胞は、真皮コラーゲンからの SHG シグナルを目安にすることで特定した。真皮においては細胞が

疎に存在しているが、これらは線維芽細胞や腺細胞、免疫細胞と推測される。

これらの結果から、生きたマウスの背中皮膚へ適用した新規生体イメージング法は、表皮の全層を3次元的に可視化し、真皮のコラーゲン線維からの SHG 光も検出できることが示された。

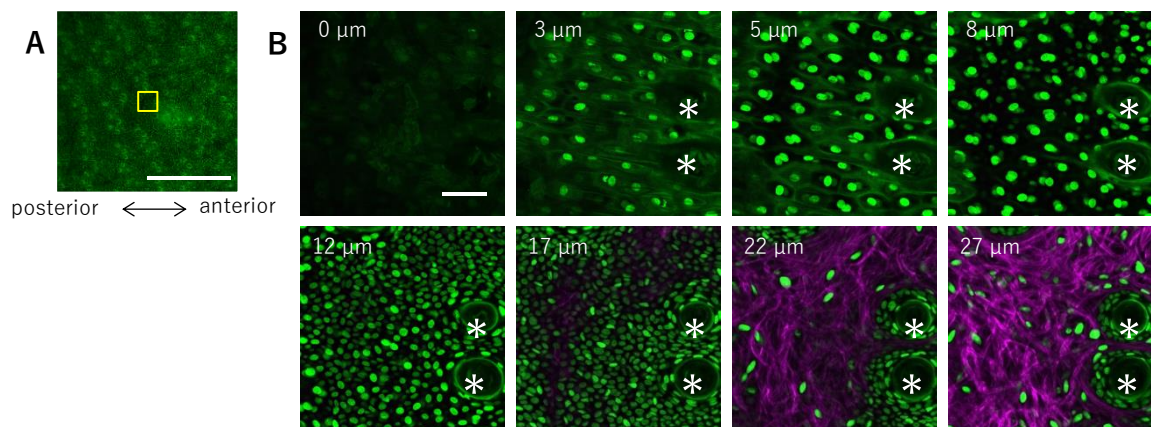


図 2 - 1 3 生きた R26H2BEGFP ヘアレスマウスの背中皮膚の画像

(A) 低倍のレンズを使って背中中の皮膚を観察した共焦点画像。スケールバーは 1 mm を示す。(B) 2 光子励起顕微鏡を使って励起波長 900 nm で観察した光学切片画像で、A における黄色の枠で示された領域で高倍のレンズで取得した画像。各画像の上側の数字は表面からの深さを示す。白いアスタリスクは毛包を示す。スケールバーは、50 μm を示す。

2-3-3 様々な部位における皮膚の3Dイメージング

次に、様々な部位における表皮の構造や細胞の挙動を比較するため、耳・足の裏・尻尾についても2光子励起顕微鏡を使って非侵襲な観察を試みた。これらの部位は、プラスチックテープによって皮膚をガラスボトムディッシュに固定することで、安定に保持できた。観察の結果、足の裏や、尻尾のような厚い表皮構造も、深部まで可視化することに成功した(図2-14)。尻尾の表皮では、角質層でGFPによって核の形が保持されている領域をscale領域を特定できることがわかった。つまり、H2BEGFPシグナルによってscale領域と、interscale領域を区別できることが示された(図2-14、G、H)。5箇所(背中、耳、足の裏、interscale(尻尾)、scale(尻尾))の構造を定量的に比較するため、3次元画像から表皮の厚さと基底細胞密度の測定を行った。表皮の厚さは、H&E染色による切片から測定した厚さとおおよそ一致していた(図2-11、B、Cと図2-14、I、J)。基底細胞密度は、厚さが厚い表皮の方が高いように見える(図2-15)、実際、基底細胞密度と表皮の厚さは、相関係数0.83以上で、相関していた(図2-14、K)。この発見は、基底細胞密度は表皮の厚さを維持するメカニズムに関連することを示唆する。

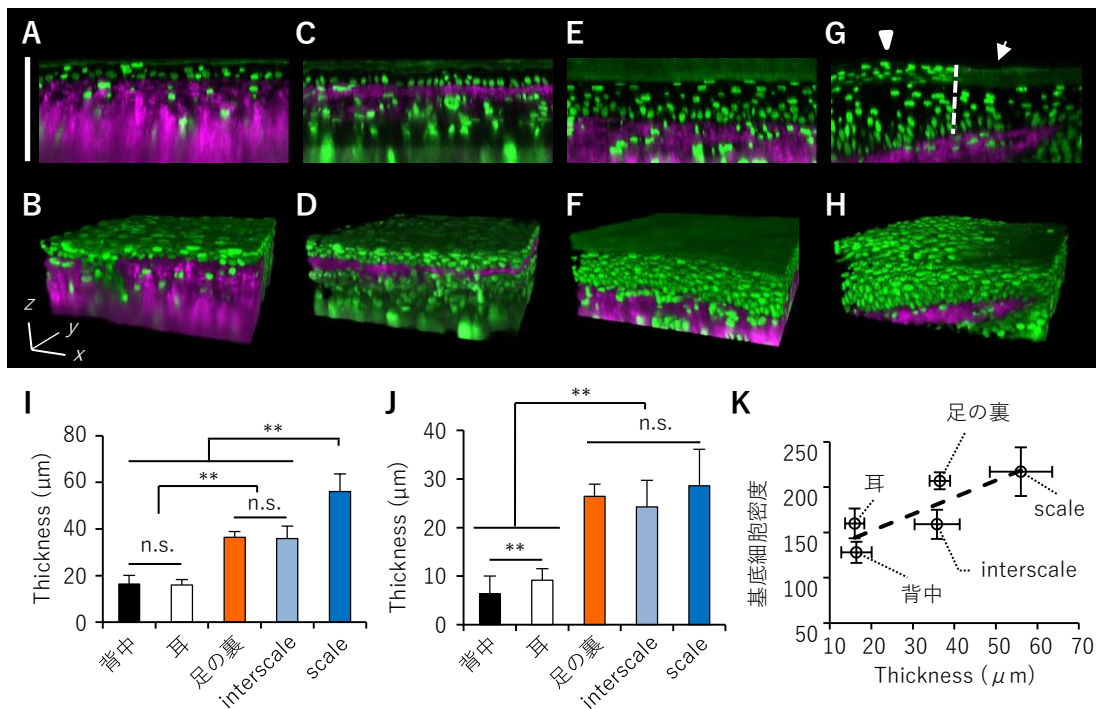


図 2 - 1 4 3次元的な表皮構造の比較

(A - H) A, Bは背中、C, Dは耳、E, Fは足の裏、G, Hは尻尾の画像を示す。A, C, E, G はxz面における画像、B, D, F, Hは3次元構築画像を示す。スケールバーは100 μmを示す。(I, J) 表皮の厚さ(角質層以外) Iと、角質層の厚さJを示す。これらのデータは各部位で5 - 7匹のマウスから21 (背中)、15 (耳)、15 (足の裏)、14 (interscale)、14 (scale) の点を測定した結果であり、Steel-Dwass検定を使って比較した。エラーバーは、標準偏差を示す (* $P < 0.05$; n.s., not significant)。(K) 基底細胞密度と表皮の厚さIとの関係を示す。相関係数は0.837。点線は回帰曲線を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

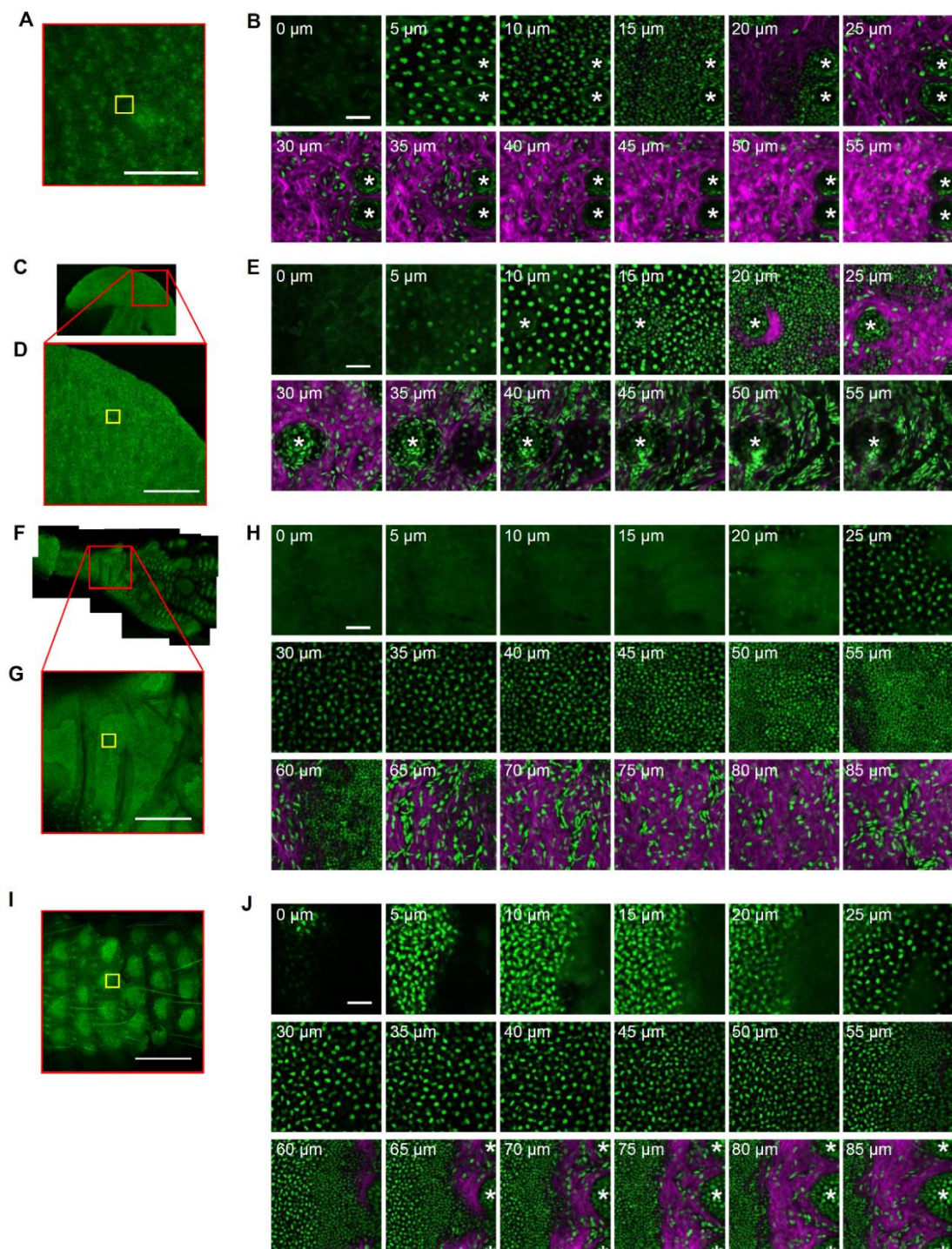


図2-15 R26H2BEGFP ヘアレスマウスの背中

(A, C, D, F, G, I) 低倍のレンズを使って背中 A、耳 C, D、足の裏 F, G、尻尾 I を観察した共焦点画像。スケールバーは 1 mm を示す。(B, E, H, J) 2 光子励起顕微鏡を使って励起波長 900 nm で観察した光学切片画像で、A, D, G, I における黄色枠で示された領域を示す。各画像の上の数字は表面からの深さを示す。白いアスタリスクは毛包を示す。スケールバーは、50 μm を示す。

2-3-4 タイムラプスイメージング

まず、背中と耳の皮膚について4時間のタイムラプスイメージングを行った結果、複数の細胞分裂を観察することに成功した(図2-16、A)。また、細胞分裂の分裂期を区別できる程度まで、染色体の形態変化を、高精細に可視化することができた(図2-16、B)。具体的には、分裂中期に染色体が細胞の中心に並び、分裂後期に2つに分かれ、反対の極まで動き止った。その後、分裂終期に分かれた2グループの染色体は、カシューナッツが向き合ったような形を形成し、最終的には楕円体のような形を形成したのが観察された。分裂の様子を3次元的にみると、背中と耳において、2つの娘細胞は、親細胞と同じ深さに位置したように見えた。つまり、基底膜に対してほぼ平行に分裂した(図2-16、C)。背中と耳の表皮において観察できた分裂は、基本的に、ほぼ基底膜に対し平行に分裂しているように見えた。基底細胞密度はおおよそ維持されているはずなので、平行分裂した数と同じ程度の数の細胞が基底層から基底上層へ移動すると考えられる。しかしながら、4時間の観察中に基底層から基底上層に移動した細胞は一度も見つけることができなかった。基底層内を素早く移動している細胞はいたが、それはおそらく免疫細胞の一種だと推測される。

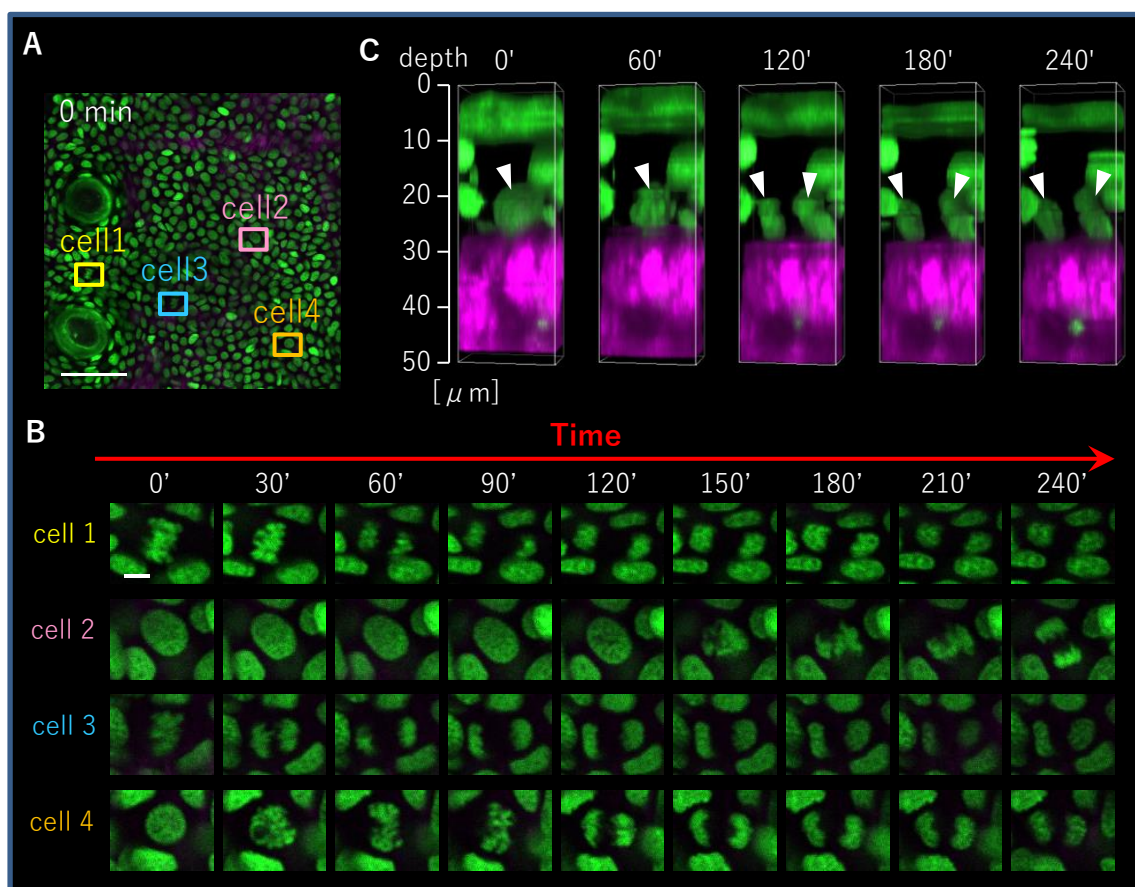


図 2-16 背中皮膚のタイムラプス画像

(A) 0 min における背中表皮の基底層付近の画像。スケールバーは 50 μm を示す。(B) A に示した 4 つの枠によって示された領域の 4 つの細胞のタイムラプス画像。スケールバーは 5 μm を示す。(C) A, B における cell 4 の 3 次元的なタイムラプス画像。

次に、足の裏と尻尾の皮膚においても4時間のタイムラプスイメージングを行った。その結果、厚い表皮においても分裂細胞をきれいに可視化することに成功した（図2-17）。その多くは、平行分裂であったが、一方で、背中と耳ではほとんど見られなかったような基底膜に対して“斜め”方向に分裂する細胞が観察された。斜め分裂では染色体が逆方向に2つに分かれる時、片方は分かれる前よりも上側に、もう片方は下側に向かって移動した（図2-17、A、B）。上側の娘細胞は基底上層に位置するように見え、下側の娘細胞は基底層に存在するように見えた（図2-17、C、D）。基底層から基底上層に移動する細胞は、背中と耳と同様に、見つけることができなかった。これらの結果は、厚い表皮のターンオーバーにおいて、基底細胞の上側への移行の一部は、少なくとも斜め分裂によって行われていることを示唆する。

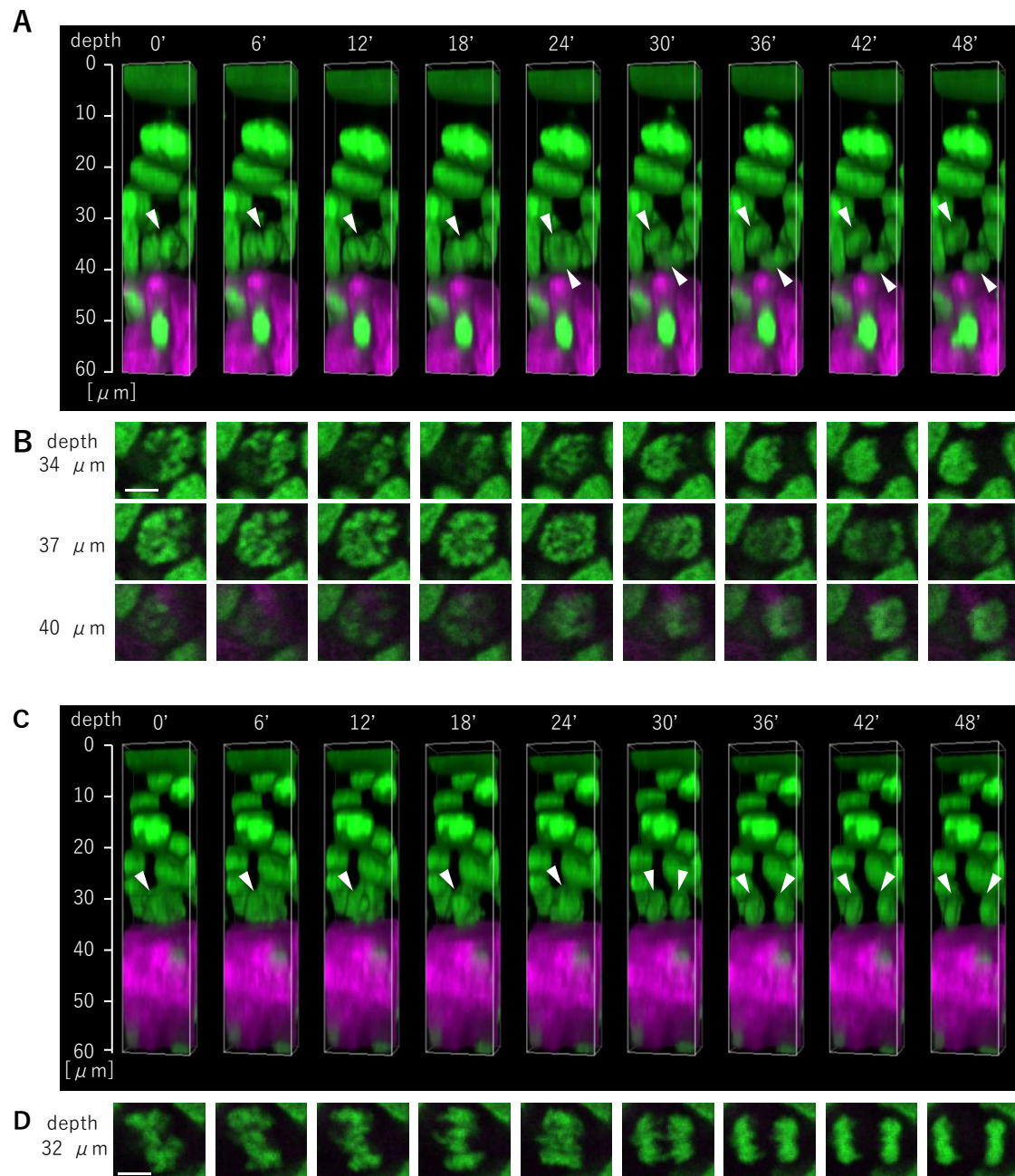


図 2 - 1 7 足の裏のタイムラプス画像

(A) 基底膜に対し斜め方向に分裂した細胞の 6 min ごとの 3 次元画像。白い矢頭は分裂中の細胞を示す。(B) A に示した分裂細胞の表面からの各深さにおける x - y 平面画像。スケールバーは $5\ \mu\text{m}$ を示す。(C) 基底膜に対し平行に分裂している細胞の 6 min ごとの 3 次元画像。(D) C に示した分裂細胞の表面からの深さ $32\ \mu\text{m}$ での xy 画像。スケールバーは $5\ \mu\text{m}$ を示す。

2-3-5 分裂方向の解析

表皮の厚さと基底細胞の分裂方向の関係を調べるために、細胞分裂の3次元的方向を定量的に解析した。まず、皮膚表面に対して平行な横方向成分の角度分布を測定した。各部位において、基準となる方向を決め、その方向と、分裂方向の横方向成分との角度を測定した（図2-18）。平均角度と標準偏差は、背中では $34.8 \pm 26.3^\circ$ 、耳で $54.0 \pm 22.0^\circ$ 、足の裏で $34.4 \pm 25.7^\circ$ 、尻尾の interscale で $57.8 \pm 25.9^\circ$ 、scale で $49.4 \pm 21.3^\circ$ だった。部位によって、わずかに角度分布にわずかな偏りがあるように見えるが、標準偏差は全ての部位で高かった。従って、これらの結果は、分裂方向の横方向成分の分布に明らかな偏りは存在せず広範囲に分布することを示唆する。

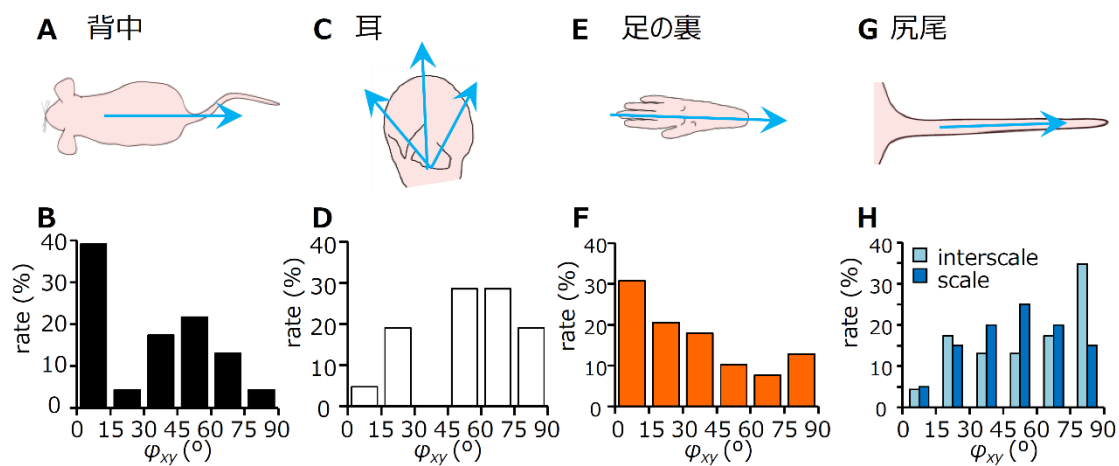


図 2 - 1 8 細胞分裂方向の皮膚表面に平行な成分での解析結果

(A, C, E, G) 各表皮における、細胞分裂の皮膚表面に平行な成分の測定についての概略図。青線は基準線を示す。背中 **A** と尻尾 **G** は毛包の向きを基準となる方向とし、それは体軸とほぼ同じ方向を示す。耳 **C** も毛包の向きを基準とし、それは耳のエッジに対しておおよそ垂直な方向を向く。足の裏 **E** は、かかととつま先を結ぶ線を基準線とした。(B, D, F, H) 背中 **B**、耳 **D**、足の裏 **F**、尻尾 (interscale と scale) **H** の表皮における、細胞分裂の皮膚表面方向成分の分布。

次に、基底膜面に対する細胞分裂の方向を測定した。測定の際は、SHG を指標にした表皮と真皮の境界を指標にして測定した（図 2 - 19、A）。平均角度と標準偏差は、背中で $3.9 \pm 3.5^\circ$ 、耳で $6.9 \pm 13.3^\circ$ 、足の裏で $17.0 \pm 17.6^\circ$ 、尻尾の interscale 領域で $13.2 \pm 14.9^\circ$ 、scale 領域で $28.5 \pm 20.9^\circ$ だった。背中と耳の表皮においては、90%以上の細胞分裂が $0 - 20^\circ$ だった。つまり、ほとんどの細胞分裂は基底膜面に対して平行であることを示す。足の裏の表皮と尻尾の interscale 領域は似たような分布を示し、だいたい 30%の斜め分裂（ $20 - 70^\circ$ ）、70%の平行分裂を示した。scale 領域は他とは異なり、細胞分裂の半分以上が斜め分裂だった。一方で、垂直分裂（ $70 - 90^\circ$ ）はすべての部位においてほとんど見られなかった。斜め分裂頻度と表皮の厚さの関係を調べた結果、斜め分裂の割合は、強く表皮の厚さと相関していた（相関係数 0.98 以上）（図 2 - 19、E）。これらの結果は、細胞分裂の 3 次元方向の分布が部位によってことなり、表皮の基底細胞の斜め分裂は表皮の厚さの維持に関連することを示唆する。更に、部位による分類をせず、図 2 - 19 (C)と同じ細胞集団について細胞分裂方向（斜め分裂頻度ではない）と、表皮の厚さの関係を調べたところ、Spearman の順位相関係数の値は 0.428 となり、中程度に相関するということが示された（図 2 - 20）。従って、これは斜め分裂頻度と表皮の厚さが相関することを支持する結果であると考えられる。

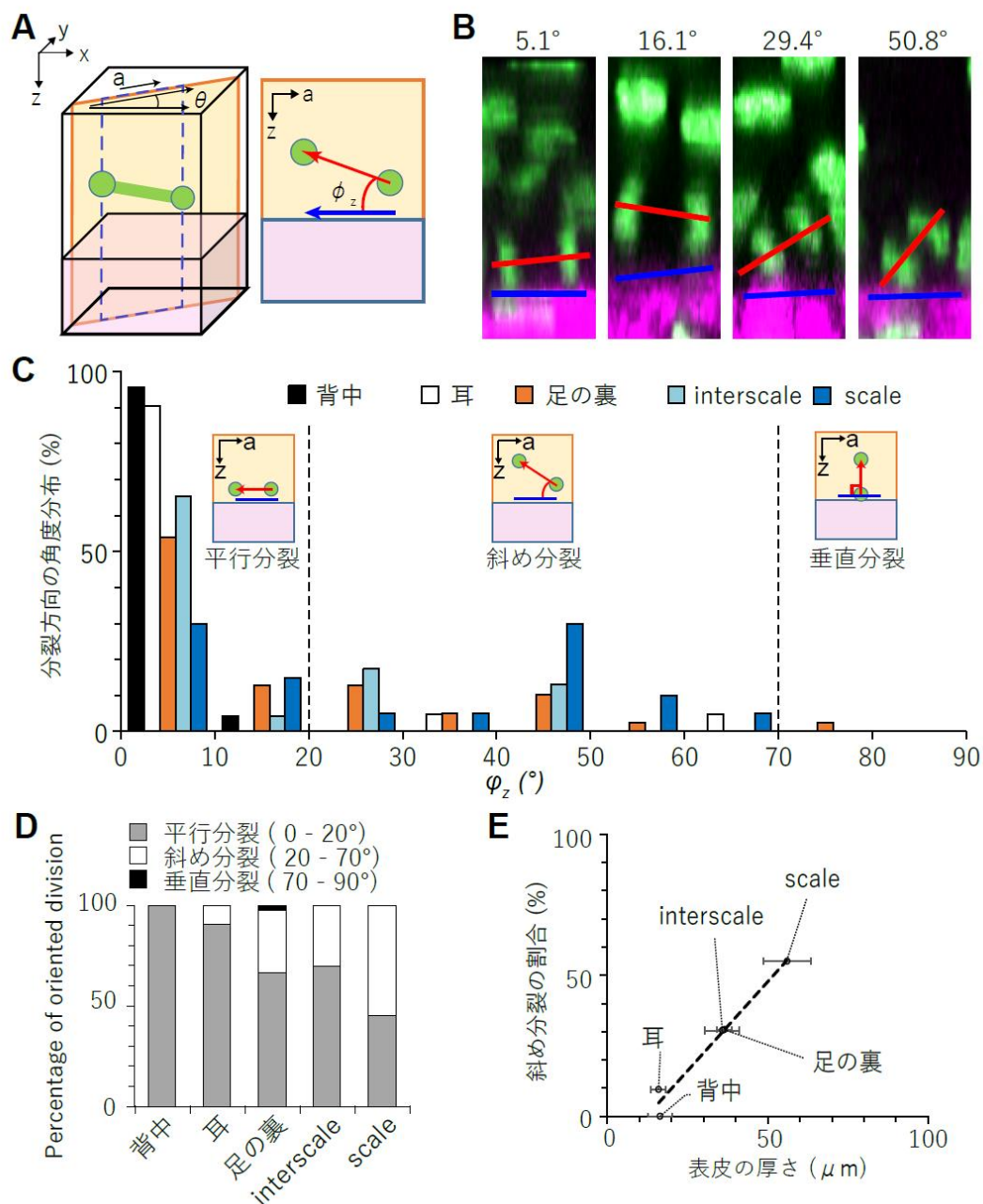


図2-19 基底膜に対する分裂方向の解析

(A) 細胞分裂方向の測定の概略図。"a"の方向は xy 面における分裂方向の成分を示す。角度は az 面から測定した。(B) 足の裏の細胞分裂の方向を測定している例。(C) 各部位の皮膚から測定した分裂方向のヒストグラム。このデータは、23 (背中)、21 (耳)、39 (足の裏)、23 (interscale)、20 (scale) の分裂細胞から測定した。(D) Cにおける、平行分裂 ($\phi_z \leq 20^\circ$) と、斜め分裂 ($20^\circ < \phi_z \leq 70^\circ$)、垂直分裂 ($70^\circ < \phi_z \leq 90^\circ$) の割合。(E) 表皮の厚さ (図2-14、I) と斜め分裂 D の割合との関係を示す。相関係数は 0.986 だった。点線は、回帰直線を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

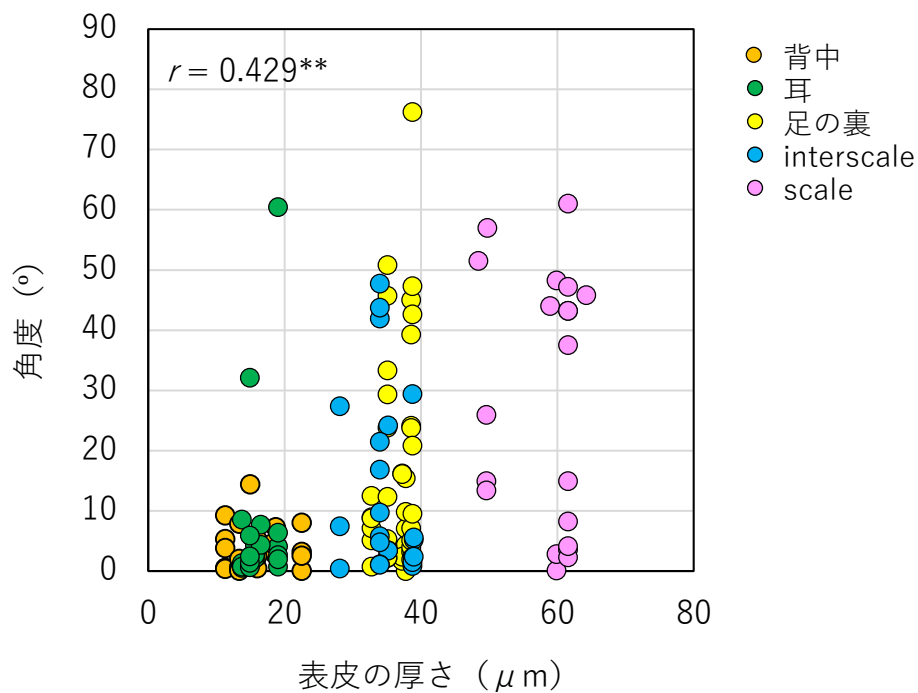


図 2-20 分裂方向と表皮の厚さの関係

データは図 2-19 (C)と同じ集団であり分裂細胞を示す。詳細には、背中 ($n = 23$, マウス 7 匹)、耳 ($n = 21$, マウス 5 匹)、足の裏 ($n = 39$, マウス 6 匹)、interscale ($n = 23$, マウス 6 匹)、scale ($n = 20$, マウス 7 匹) から成り、計 126 個である。各々の分裂細胞に対する表皮の厚さは、マウス毎の平均の厚さを示す。 r は Spearman の順位相関係数を示し、 $r = 0.429^{**}$ ($**P < 0.01$) となる。

2-4 考察

2-4-1 生体イメージングにおける 2 光子励起顕微鏡の利点

共焦点顕微鏡と 2 光子励起顕微鏡で、背中と足の裏の皮膚の同一視野を観察した画像を比較すると、2 光子励起顕微鏡の方が高いコントラストの画像を得ることができる（図 2-21）。従って、本研究ではマウス皮膚を観察するために、2 光子励起顕微鏡を使用し、その結果、表皮の基底細胞の分裂期における染色体の微細な形態変化の可視化に成功した。皮膚の観察において、共焦点顕微鏡と比較して 2 光子励起顕微鏡が優れている理由はいくつかある（詳細は、第 1 章序論“1-1-1 レーザー走査型顕微鏡”、“1-1-3 2 光子励起顕微鏡と生体イメージング”に記載）。2 光子励起顕微鏡では、励起光に近赤外域の波長を利用するため、皮膚内における散乱や吸収の影響を抑えることができ、励起光の深部到達性が高い。その後に発する蛍光は可視域の波長だが、2 光子顕微鏡ではピンホールが不要なため NDD(Non-Descanned Detector) を使えるので、組織内における散乱光も検出可能である。更に、本研究では、高感度な GaAsP ディテクターを用いており、そのことも高い S/N 比の画像を取得するために重要であった。更に、2 光子励起顕微鏡を利用したことにより、共焦点顕微鏡では可視化できない真皮コラーゲンからの SHG シグナルを取得できた。この SHG シグナル

により表皮と真皮の境界面が明確になった。加えて、3次元的な細胞分裂の方向を調べる際は、基底膜面を推測するために SHG シグナルが必要であった。

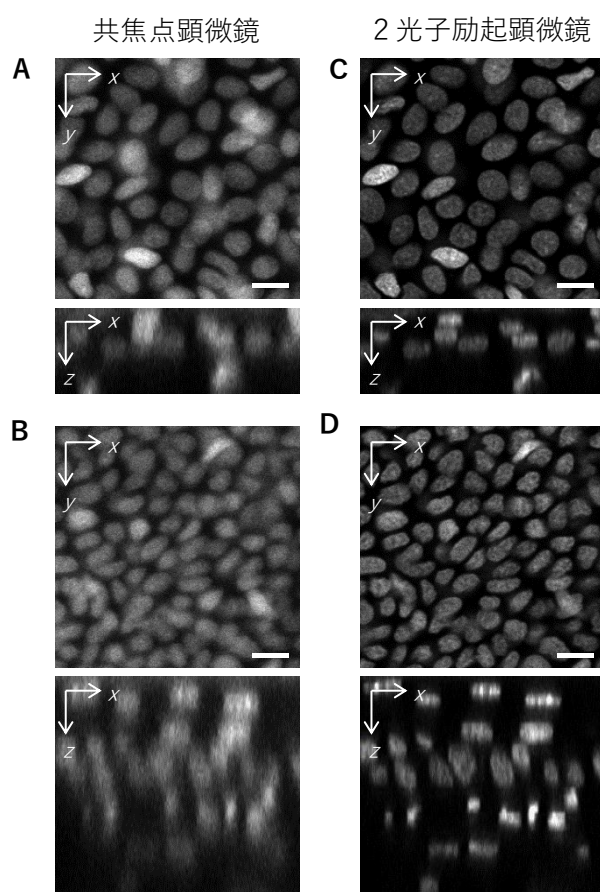


図 2 - 2 1 皮膚観察における共焦点顕微鏡と 2 光子励起顕微鏡の比較

(A, B) 背中 A と足の裏 B の表皮の xy 面と xz 面の共焦点画像。ピンホールは 1 A.U. (C, D) 背中 C と足の裏 D の表皮の xy 面と xz 面の 2 光子励起画像。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ を示す。

2-4-2 生体イメージングにおけるヘアレスマウスの利点

2光子励起顕微鏡でマウスの皮膚を観察するためには、メラニンを保有しない、かつ体毛がない、という条件を満たすマウスを用いることが望ましい。なぜなら、2光子励起顕微鏡で励起光として用いる超短パルスレーザーは、瞬間的に非常に強いパワーを出すため、メラニンが励起光を吸収することで熱が発生し、その熱によって皮膚が損傷を受ける恐れがある(Li *et al.*, 2012)。加えて、検出時においても、メラニンの非常に強い自家蛍光シグナルにより画像が乱れるといった問題が発生する。また、体毛のあるマウスにおいて、除毛せずに皮膚をそのまま観察することは、毛が妨げとなるため、光学的にほぼ不可能である。そのため、体毛のあるマウスの皮膚を観察するためには、除毛クリームを使ったり、かみそりで毛を剃る必要がある。しかし、これらの方法は、表皮にダメージを与えたり炎症を惹き起こす可能性があるため、できるだけ避けるべきである (Li *et al.*, 2012)。また、本研究では実施しなかったが、体毛のないマウスは薬剤による塗布や、物理的刺激等を与えたときの皮膚の観察にも適している。体毛のあるマウスを用いる場合は、同様に除毛が必要であり、刺激前に除毛しても、その数日後には毛が生えてきてしまい、再び除毛する必要がある。その点、ヘアレスマウスは、刺激に対する応答の長期経時変化を観察するのに非常に適している。

従って、2光子励起顕微鏡で生きたマウス皮膚を非侵襲に観察するためには、本研究で樹立したような、アルビノでかつ体毛のないマウスを用いることが重要となる。ただし、ヘアレスマウスは毛のあるマウスと比べて、皮膚における構造にいくつか違いがあることが知られている (Benavides *et al.*, 2009)。従ってヘアレスマウスでの結果と、毛の生えたマウスでの結果が一致しない可能性は有り得るため、結果の解釈には注意が必要である。それについては、ヒトと比較するとどれくらい違うかという問題にもなるため、どちらの結果が合っているという議論にはならないと考えられる。

2-4-3 観察方法について留意すべき点

耳・足の裏・尻尾の皮膚の生体イメージングについては、プラスチックテープを使った簡易な方法により安定な観察が可能であった。一方で、背中については呼吸や心拍による体動の影響が強く、顕微鏡下で保持するためには工夫が必要であった。そこで、体動の影響を抑えるために、背中の皮膚を強力なマグネットで挟んで物理的な強い力で保持すると、体動の影響が抑えられたが、皮膚表面が正常な色（ピンク色）ではなくなり、白色や黄色になっていた。これは局所的な

虚血が発生していると考えられ、そのような表皮を観察し続けると、観察して2時間後くらいから分裂期に入っていない細胞については核の形がだんだん崩れていき、分裂期に入っていた細胞は分裂を停止してしまうことがあった。このように、外科的、もしくは化学的処置がなくても、保持する方法によっては影響を与えているかもしれないことは留意すべきである。そのため本研究では、4時間の中で、表皮の細胞の核の形が変形せず細胞分裂も捉えられる保持の仕方について検討を行う必要があった。検討した結果、観察部位の皮膚の色がその他の皮膚の色と同じくらいになることを指標として保持することで、4時間の観察で明らかな細胞異常が見られることはなくなった。保持方法によって正常な状態とどのくらい同じ状態を観察できるのかが変化するため、皮膚に限らず様々な組織におけるマウスの *in vivo* イメージングでは、組織への影響が少ない保持方法を確立することが非常に重要である。

2-4-4 4次元イメージングからの分裂方向の測定

皮膚における細胞分裂の方向の測定は、基本的には皮膚表面に対して垂直にスライスされた皮膚切片のサンプルから測定されていた。その場合、皮膚の断層

面に対して奥行き方向の成分の情報が失われるため、正確な角度を測定するのは難しい。例えば、基底膜に対して斜め方向の分裂が、垂直方向の分裂だと判断されてしまう場合が考えられる。これに対し、分裂方向の3次元的な解析は、アダルトマウスの耳(Doupé *et al.*, 2010)と尻尾(Clayton *et al.*, 2007)の皮膚について過去に実施されている。彼らの研究では、真皮から表皮を剥がした“固定表皮シート”を用いて共焦点顕微鏡で3次元的に観察を行っている。また、彼らの結果は、本論文における耳と尻尾の interscale 領域での結果とおおよそ一致しているが、分裂方向の分布とその解釈にはわずかな違いがある。ただし、尻尾での報告に関しては、2種類の表皮が存在するのにも関わらず、interscale 領域と scale 領域を区別して実施しているかは明記されていなかったため、詳細に比較することはできない(Clayton *et al.*, 2007)。本研究では、分裂方向の測定を、染色体の移動している方向も含めて4次元的 (x, y, z, t) に実施した。従って、これまでの知見よりも、分裂方向を正確に測定できていると考えられる。一方で、本研究では、H2BEGFP による核のみの蛍光標識により分裂方向を測定したため、斜め分裂によって上層へ移行した娘細胞の一部が基底膜に接している可能性は否定できない。上層へ移行した娘細胞が本当に基底膜に接していないかどうかを明確にするためには、形質膜を可視化することが必要になる。例えば、蛍光色素

が結合したレクチンの皮内注 (Egawa *et al.*, 2013)や形質膜が可視化されているマウスとの交配 (Abe *et al.*, 2011)によって可能となるだろう。

2-4-5 表皮の恒常性維持モデル

本研究では、観察した全ての部位の表皮において、平行分裂を検出した。平行分裂は2つの基底細胞を産生するが、基底細胞密度はおおよそ一定に維持されていると考えられているので、平行分裂の数は基底層から基底上層に移動する細胞の数と等しくなるはずである (Clayton *et al.*, 2007; Doupé *et al.*, 2010)。しかし、本研究では4時間のタイムラプスイメージングの間に基底層から基底上層に移動する細胞を検出することができなかった。それゆえ、基底細胞は非常にゆっくりと、おそらく数日単位で移動していると予想される (図2-22、A)。これに対し、斜め分裂は、分裂と同時に基底上層の細胞を産生する。そのため、斜め分裂は基底細胞数には影響を与えずに、速く基底上層の細胞を供給できる。一方で、本研究で表皮の厚さと基底細胞密度との相関が示された。また、過去の研究で、厚い表皮ほど Ki67 などを指標として増殖細胞の数や割合が多いことが

報告されている (Porter *et al.*, 1998; Naetar *et al.*, 2008)。これらのデータは厚い表皮における細胞分裂の数が、薄い表皮よりも非常に多いことを意味する。

簡単な表皮のモデルとして、表皮は増殖能をもつ細胞がいる基底層 (layer a)、分化した細胞がいる基底上層 (layer b)、角化した層 (layer c) の 3 つの層に分けて考えることができる (図 2 - 2 2、B)。それぞれの層における細胞数が一定だと仮定すると、各層における細胞数の増減は全て細胞分裂数と等しくなる ($m = t_{a \rightarrow b} = t_{b \rightarrow c} = t_{c \rightarrow d}$)。従って、厚い表皮では、薄い表皮と比べて、細胞の上への流れが早いことを意味する。つまり、厚い表皮の方が薄い表皮よりも基底層から基底上層に供給される細胞が多い。それゆえ、厚い表皮において斜め分裂頻度が高いことは、基底上層への細胞供給を加速する役割をもつ可能性が考えられる。

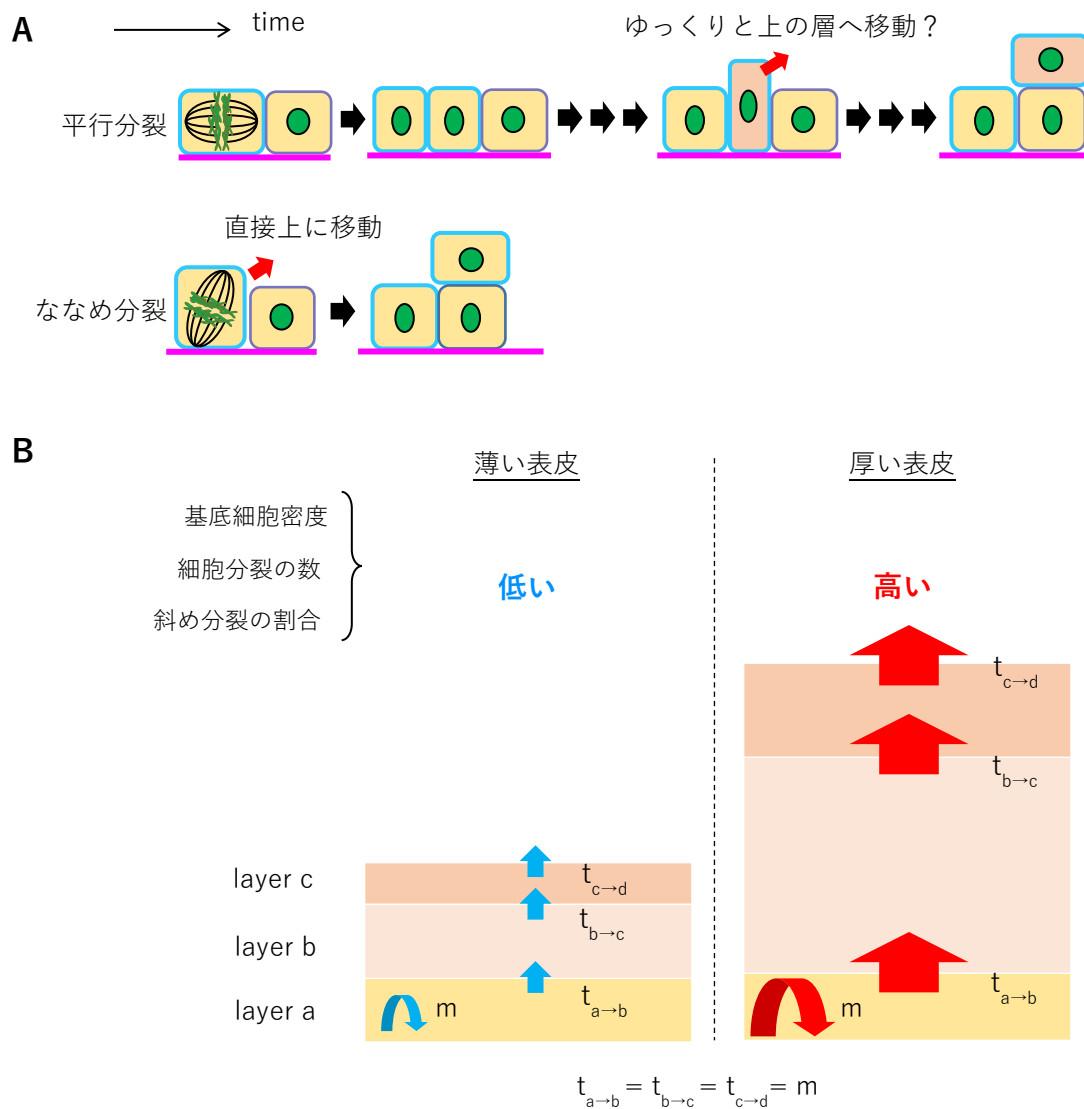


図 2 - 2 2 本研究の結果を元にした表皮モデル

(A) 平行分裂と斜め分裂の概略図。 (B) 薄い表皮と厚い表皮の維持モデル。

$t_{a \rightarrow b}$ は、layer a から layer b に移動する細胞数、 $t_{b \rightarrow c}$ は layer b から layer c に移動する細胞数、 $t_{c \rightarrow d}$ は layer c から細胞が剥がれ落ちる数を示す。m は細胞分裂数を示す。

2-4-6 分裂軸を決定する分子メカニズムについて

発達期の表皮において細胞分裂の方向は、 $G\alpha_i$ 、mInsc、LGN、NuMA、Par-3、aPKC といった分子の細胞内局在によって決定され则认为られている (Lechler and Fuchs, 2005; Siller and Doe, 2009; Kulukian and Fuchs, 2013; Williams *et al.*, 2014)。加えて、最近、胎仔期において PDK1 は分裂細胞の aPKC と Par-3 を細胞の頂端側へリクルートし、活性化するという重要な役割をもち、分裂軸の決定のために重要であることが示されている (Dainichi *et al.*, 2016)。一方で、アダルトマウスの表皮においては、aPKC λ の欠損マウスの皮膚での報告がある (Niessen *et al.*, 2013)。それによると、正常なマウスよりも分裂方向が垂直方向にシフトしており (60–90° の分裂頻度が増え)、加えて、表皮の厚さは、正常なマウスよりも厚いことが示されている (Niessen *et al.*, 2013)。加えて、本研究において、表皮の厚さと斜め分裂頻度に相関があったことから、胎仔期のマウスだけではなくアダルトマウスの表皮においても上記に挙げた分裂軸を制御するタンパク質が、分裂方向を制御することにより、表皮の厚さを制御していることが考えられる。アダルトマウスにおける分裂方向とその分子メカニズムを明らかにするためには、これら分子の可視化させたマウスや、関連分子を欠損さ

せたマウスを組み合わせることで、本研究で確立した観察方法は、有用になるだろう。

2-4-7 今後の展望

本研究において、マウスの樹立や観察方法の確立を含む新規2光子励起顕微鏡法を確立することにより、異なる部位における表皮の形態学的な特徴と細胞分裂の方向との関連を示した。本研究の結果は、表皮の厚さの維持に新たな見解をもたらすことが期待される。更に、新規2光子励起顕微鏡法は、表皮の恒常性維持のメカニズムを明らかにするのに役に立つと考えられる。また、それだけではなく、薬剤の皮膚への効果や影響を調べるために有用となることが期待される。

2-5 本研究のまとめ

本研究では、背中・耳・足の裏・尻尾の皮膚について非侵襲的な *in vivo* イメージング法を確立した。2光子励起顕微鏡を用いて観察したところ、各々の部位において細胞分裂を高精細に可視化することに成功した。また、3次元的に分裂方向を解析した結果、厚い表皮ほど、斜め方向の分裂頻度が高い傾向があることが判明した。

参考文献

Abe, T., Kiyonari, H., Shioi, G., Inoue, K., Nakao, K., Aizawa, S., and Fujimori, T. (2011). Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging. *Genesis* 49, 579-590.

Aoki, K., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2013). Fluorescence resonance energy transfer imaging of cell signaling from in vitro to in vivo: basis of biosensor construction, live imaging, and image processing. *Dev Growth Differ* 55, 515-522.

Benavides, F., Oberyshyn, T.M., VanBuskirk, A.M., Reeve, V.E., and Kusewitt, D.F. (2009). The hairless mouse in skin research. *J Dermatol Sci* 53, 10-18.

Cayouette, M., and Raff, M. (2003). The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina. *Development* 130, 2329-2339.

Clayton, E., Doupé, D.P., Klein, A.M., Winton, D.J., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446, 185-189.

Dainichi, T., Hayden, M.S., Park, S.G., Oh, H., Seeley, J.J., Grinberg-Bleyer, Y., Beck, K.M., Miyachi, Y., Kabashima, K., Hashimoto, T., and Ghosh, S. (2016). PDK1 Is a Regulator of Epidermal Differentiation that Activates and Organizes Asymmetric Cell Division. *Cell Rep* 15, 1615-1623.

Doupé, D.P., Klein, A.M., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2010). The ordered architecture of murine ear epidermis is maintained by progenitor cells with random fate. *Dev Cell* 18, 317-323.

Egawa, G., Natsuaki, Y., Miyachi, Y., and Kabashima, K. (2013). Three-dimensional imaging of epidermal keratinocytes and dermal vasculatures using two-photon microscopy. *J Dermatol Sci* 70, 143-145.

Fischer, H., Langbein, L., Reichelt, J., Praetzel-Wunder, S., Buchberger, M., Ghannadan, M., Tschachler, E., and Eckhart, L. (2014). Loss of keratin K2 expression causes aberrant aggregation of K10, hyperkeratosis, and inflammation. *J Invest Dermatol* *134*, 2579-2588.

Gomez, C., Chua, W., Miremadi, A., Quist, S., Headon, D.J., and Watt, F.M. (2013). The interfollicular epidermis of adult mouse tail comprises two distinct cell lineages that are differentially regulated by Wnt, Edaradd, and Lrig1. *Stem Cell Reports* *1*, 19-27.

Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R.J., and Cotsarelis, G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* *11*, 1351-1354.

Jones, P., and Simons, B.D. (2008). Epidermal homeostasis: do committed progenitors work while stem cells sleep? *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 82-88.

Jones, P.H., Simons, B.D., and Watt, F.M. (2007). Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell? *Cell Stem Cell* *1*, 371-381.

Kabashima, K., and Egawa, G. (2014). Intravital multiphoton imaging of cutaneous immune responses. *J Invest Dermatol* *134*, 2680-2684.

Kilarski, W.W., Güç, E., Teo, J.C., Oliver, S.R., Lund, A.W., and Swartz, M.A. (2013). Intravital immunofluorescence for visualizing the microcirculatory and immune microenvironments in the mouse ear dermis. *PLoS One* *8*, e57135.

Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* *10*, 93-101.

Kulukian, A., and Fuchs, E. (2013). Spindle orientation and epidermal morphogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *368*, 20130016.

Kurotaki, Y., Hatta, K., Nakao, K., Nabeshima, Y., and Fujimori, T. (2007). Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* *316*, 719-723.

Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* *437*, 275-280.

Li, J.L., Goh, C.C., Keeble, J.L., Qin, J.S., Roediger, B., Jain, R., Wang, Y., Chew, W.K., Weninger, W., and Ng, L.G. (2012). Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin. *Nat Protoc* *7*, 221-234.

Naetar, N., Korbei, B., Kozlov, S., Kerenyi, M.A., Dorner, D., Kral, R., Gotic, I., Fuchs, P., Cohen, T.V., Bittner, R., Stewart, C.L., and Foisner, R. (2008). Loss of nucleoplasmic LAP2 α -lamin A complexes causes erythroid and epidermal progenitor hyperproliferation. *Nat Cell Biol* *10*, 1341-1348.

Niessen, M.T., Scott, J., Zielinski, J.G., Vorhagen, S., Sotiropoulou, P.A., Blanpain, C., Leitges, M., and Niessen, C.M. (2013). aPKC λ controls epidermal homeostasis and stem cell fate through regulation of division orientation. *J Cell Biol* *202*, 887-900.

Page, M.E., Lombard, P., Ng, F., Göttgens, B., and Jensen, K.B. (2013). The epidermis comprises autonomous compartments maintained by distinct stem cell populations. *Cell Stem Cell* *13*, 471-482.

Porter, R.M., Reichelt, J., Lunny, D.P., Magin, T.M., and Lane, E.B. (1998). The relationship between hyperproliferation and epidermal thickening in a mouse model for BCIE. *J Invest Dermatol* *110*, 951-957.

Potten, C.S. (1974). The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell Tissue Kinet* *7*, 77-88.

Potten, C.S. (1975). Epidermal cell production rates. *J Invest Dermatol* *65*, 488-500.

Ra, H., Piyawattanametha, W., Gonzalez-Gonzalez, E., Mandella, M.J., Kino,

G.S., Solgaard, O., Leake, D., Kaspar, R.L., Oro, A., and Contag, C.H. (2011). In vivo imaging of human and mouse skin with a handheld dual-axis confocal fluorescence microscope. *J Invest Dermatol* *131*, 1061-1066.

Rompolas, P., Deschene, E.R., Zito, G., Gonzalez, D.G., Saotome, I., Haberman, A.M., and Greco, V. (2012). Live imaging of stem cell and progeny behaviour in physiological hair-follicle regeneration. *Nature* *487*, 496-499.

Sada, A., Jacob, F., Leung, E., Wang, S., White, B.S., Shalloway, D., and Tumbar, T. (2016). Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. *Nat Cell Biol* *18*, 619-631.

Siller, K.H., and Doe, C.Q. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* *11*, 365-374.

Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 565-580.

Stringari, C., Wang, H., Geyfman, M., Crosignani, V., Kumar, V., Takahashi, J.S., Andersen, B., and Gratton, E. (2015). In Vivo single-cell detection of metabolic oscillations in stem cells. *Cell Rep* *10*, 1-7.

Williams, S.E., Beronja, S., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2011). Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation. *Nature* *470*, 353-358.

Williams, S.E., Ratliff, L.A., Postiglione, M.P., Knoblich, J.A., and Fuchs, E. (2014). Par3-mInsc and Gai3 cooperate to promote oriented epidermal cell divisions through LGN. *Nat Cell Biol* *16*, 758-769.

Wu, M., Smith, C.L., Hall, J.A., Lee, I., Luby-Phelps, K., and Tallquist, M.D. (2010). Epicardial spindle orientation controls cell entry into the myocardium. *Dev Cell* *19*, 114-125.

Zeng, G., Taylor, S.M., McColm, J.R., Kappas, N.C., Kearney, J.B., Williams,

L.H., Hartnett, M.E., and Bautch, V.L. (2007). Orientation of endothelial cell division is regulated by VEGF signaling during blood vessel formation. *Blood* 109, 1345-1352.

宮地良樹、松永佳世子、古川福実、宇津木龍一. (2009). 美容皮膚科学. 南山堂.

清水宏. (2011). あたらしい皮膚科学. 中山書店.

第 3 章 HRP ビームによる高分解能化

3-1 背景と目的

3-1-1 超解像顕微鏡

近年、光の回折限界を超える超解像技術が発達してきた。現在市販されている超解像顕微鏡の主な原理として、(i) ローカリゼーション法、(ii) STED 法、(iii) 構造化照明法がある (Hell, 2007; Huang *et al.*, 2010; Schermelleh *et al.*, 2010)。以下に、各手法について説明する。また、(iv) として、これらの超解像顕微鏡の欠点についてまとめた。

(i) ローカリゼーション法

ローカリゼーション法には、PALM (Photo Activation Localization Microscopy) (Betzig *et al.*, 2006) や STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) (Rust *et al.*, 2006) がある。ローカリゼーション法では、試料中の蛍光分子を 1 分子レベルでまばらに光らせ、取得した画像中の輝点の中心位置を記録することを多数繰り返し、最終的に取得した画像を統合することにより高分解像な画像を取得する (図 3-1)。そのためには、特定の波長域の光をあてる

ことで、発光可・不可の状態を切り替えることができる、もしくは蛍光の波長が変化させることができる蛍光プローブを使用する必要がある。ローカリゼーション法の空間分解能は、分子の位置を計測する正確さによって決まり、高分解能な画像を得るためには記録する蛍光分子の数を多くする必要がある。

PALM では、通常 paGFP (photoactivatable green fluorescent protein) などの蛍光タンパク質により標識された生体分子を観察するのに対し、STORM ではシアニン色素などの有機色素により染色された固定組織や固定細胞の観察を行う。また、STORM はマルチカラーイメージングが可能である。

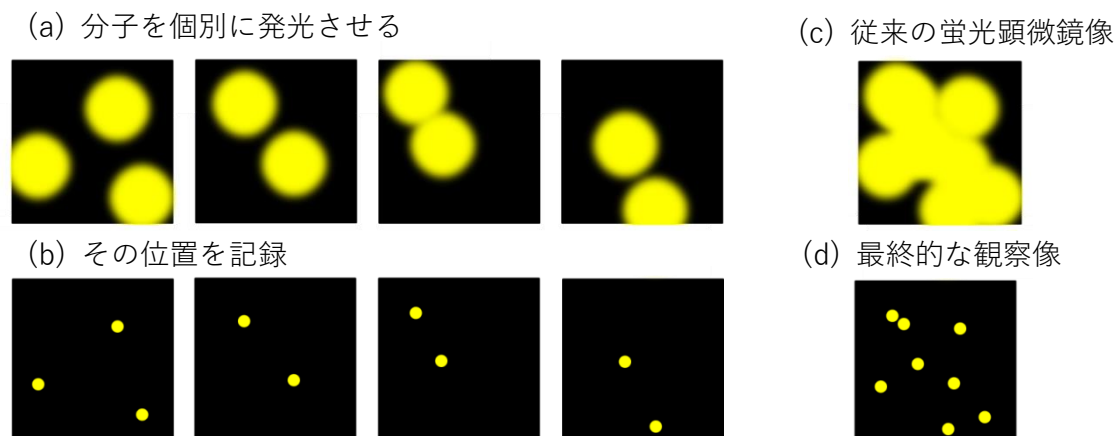


図 3 - 1 ローカリゼーション法

(ii) STED (Stimulated Emission Depletion) 法

STED 法(Hell and Wichmann, 1994; Klar and Hell, 1999)は、入射した光と同じ波長の光を放出する現象である誘導放出を利用する (図 3 - 2)。レーザー走査型顕微鏡の光学系で、役割の異なる 2 種類のレーザーを使用し、通常の励起光スポットにドーナツ状の誘導放出光を重ね、自然放出による発光領域を狭める (図 3 - 3)。誘導放出によって放出される光の波長は、照射した誘導放出光と同じになるため、それとは異なる波長の蛍光のみを取得すれば、スポット中心部分の蛍光だけを検出できる。

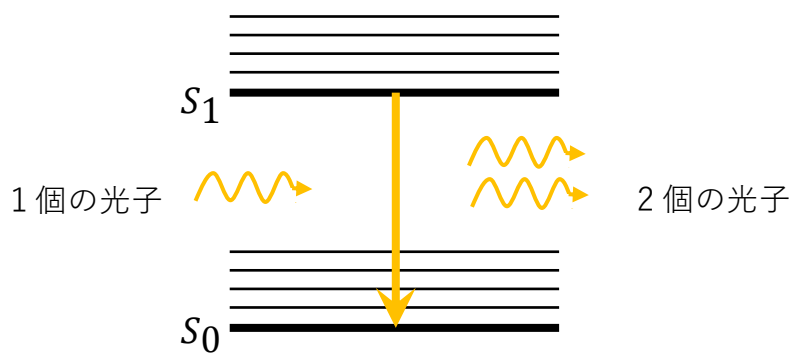


図 3 - 2 誘導放出の原理

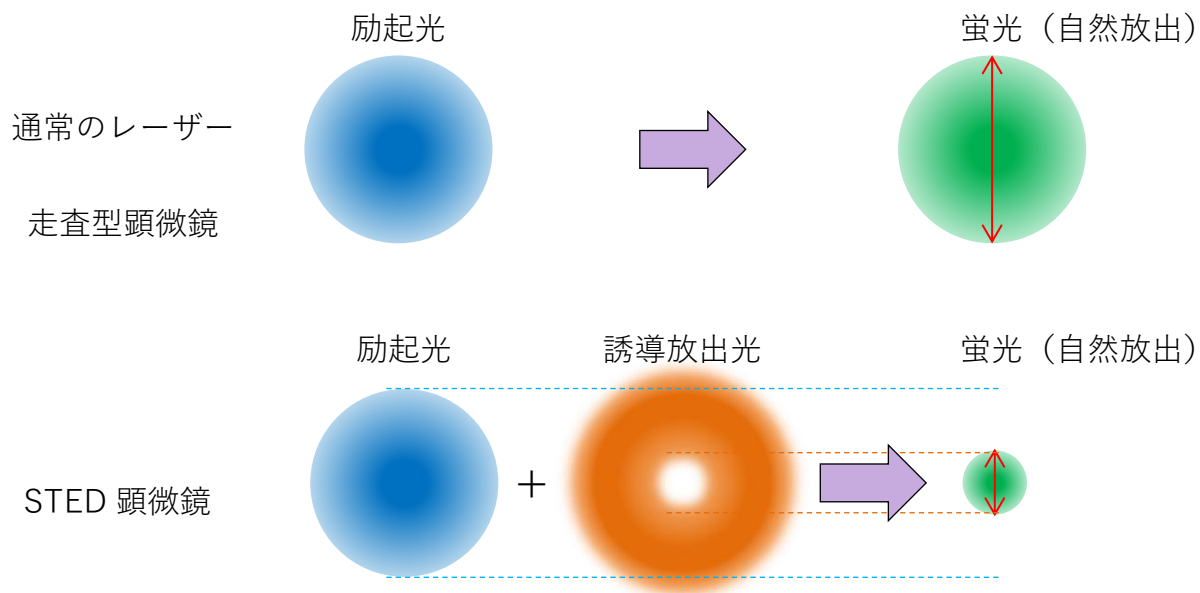


図 3 - 3 STED 顕微鏡の原理

通常のビームスポット→青色 誘導放出光→オレンジ色 蛍光→緑

(iii) 構造化照明法

アッペの結像理論より、高い空間周波数の構造では、回折の角度が大きくなる。

この角度が、対物レンズの NA で決まる角度を超える場合には、捕捉できず、像を作ることができない（図 3 - 4）。

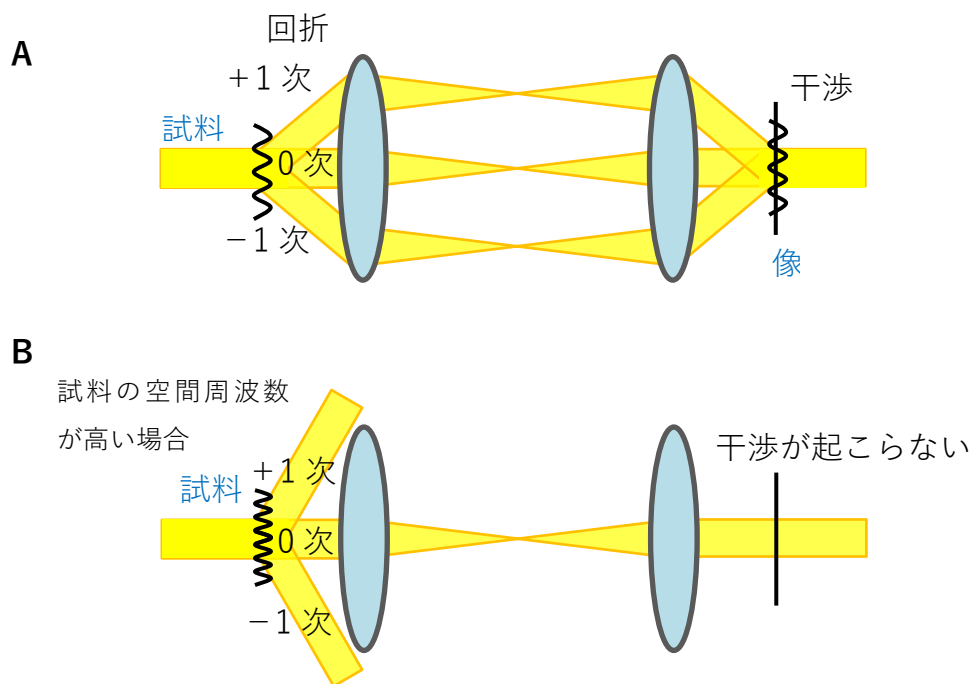


図 3 - 4 アッペの結像理論

構造化照明法では、試料に縞状のパターンの光（構造化照明）を照射し、高い空間周波数をモアレパターンと呼ばれる干渉縞を含んだ低い空間周波数に変換した画像を取得する（図 3 - 5）。構造化照明の縞の方向と位置を変化させながら複数の画像を取得し、得られた画像をフーリエ空間で結合し、高い解像度の画像に再構成する（Gustafsson, 2000）。

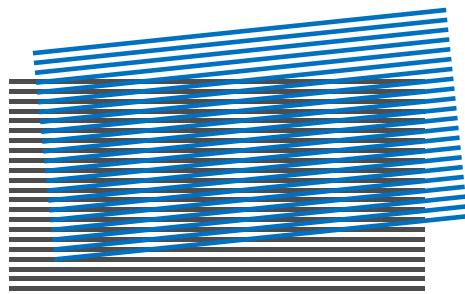


図 3 - 5 モアレパターン

(iv) 超解像顕微鏡の欠点

超解像顕微鏡は、通常の光学顕微鏡よりも高分解能な画像が得られるが、欠点も存在する。まず、蛍光分子を自由に選択できない場合がある。ローカリゼーション法では、photoactivation や photoswitch が可能な蛍光プローブで蛍光ラベルしなければならない。また、STED 法では誘導放出光の波長を考慮して蛍光プローブを選択する必要がある。更に、ローカリゼーション法や構造化照明法では、画像処理を必要とするため通常の顕微鏡よりライブイメージングが制限される場合がある。STED 法や構造化照明法の光学系は複雑なため、セットアップが大変であるが、顕微鏡そのものを購入すると非常に高価である。ローカリゼーション法では分子の位置を正確に測定するための高感度カメラが必要である。

3-1-2 高次径偏光 (HRP)

レーザービームの特性を表す、振幅、位相、偏光の分布は、マクスウェル方程式より導いた波動方程式の解として得られる。一般に使用されている多くのレーザービームは、直線偏光 (LP : linearly polarized) ビームと円偏光 (CP : circularly polarized) ビームである。LPビームは時間とともに偏光方向が変化しないのに対し、CPビームでは時間とともに偏光方向が回転するという違いはあるが、どちらも通常、ビーム断面の強度分布が理想的にはガウス分布であり、ある瞬間においてビーム断面のどの位置でも同位相で、同じ偏光状態を有する。一方で、ビーム断面において空間的な偏光分布が不均一であるビームをベクトルビームといい、ベクトルビームはベクトル波動方程式の解となる。例えば、図3-6に示すように方位偏光 (AP : azimuthally polarized) は、ビーム断面において電場が方位方向に分布する。径偏光 (RP : radially polarized) は、電場が放射状に分布している。高次径偏光 (HRP : higher-order radially polarized) ビームは、同心円状の多重リングをもつRPビームであり、リングごとに電場の向きが反転している (Kozawa and Sato, 2007)。これらのベクトルビームに対してLPビームやCPビームのような偏光分布が均質なビームをスカラービームと呼びスカラー (ヘルムホルツ) 波動方程式の解となる。本研究では、LPビームと6つの

リング構造をもつHRPビームを使用した。このHRPビームの振幅分布は(3.1)式
に示すように6次のモードのラゲールガウス分布となる。

$$|E_{06}^{TM}(r)|^2 \propto \frac{1}{w^2} \left(\frac{\sqrt{2}r}{w} \right)^2 \left[L_5^1 \left(\frac{2r^2}{w^2} \right) \right]^2 \exp \left(-\frac{2r^2}{w^2} \right) \cdot \cdot \cdot (3.1)$$

となる。ここで、ラゲール陪多項式 $L_5^1(x)$ は(3.2)式に示すようになる。

$$L_5^1(x) = 6 - 15x + 10x^2 - \frac{5}{2}x^3 + \frac{x^2}{4} - \frac{x^5}{120} \cdot \cdot \cdot (3.2)$$

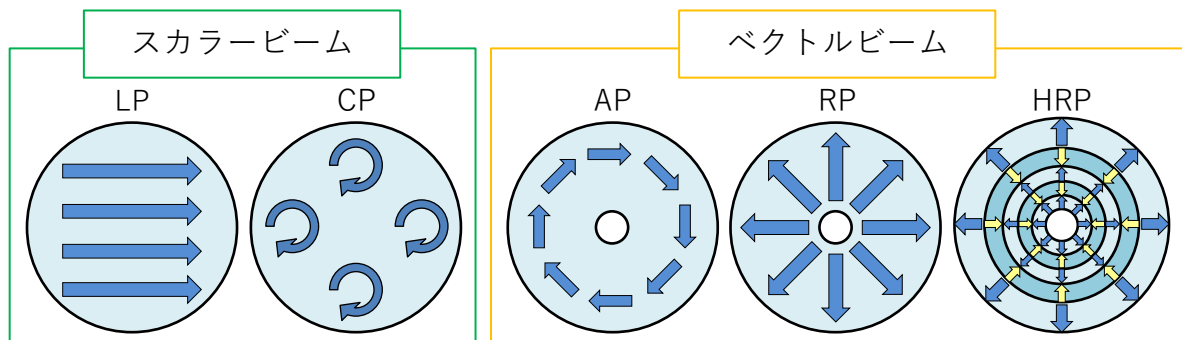


図3-6 ビーム断面の偏光方向

HRP ビームのレンズによる集光については、2007 年に東北大学多元物質科学研究所の佐藤研究室により、シミュレーション結果が報告された (Kozawa and Sato, 2007)。その報告によると、集光角を θ とするとき $\sin \theta$ が $0.6-0.7$ よりも小さなレンズで集光した場合には、HRP ビームの方が LP ビームよりも大きなビームスポットとなるが、集光角が大きなレンズを使用した場合には、LP ビームよりも小さなビームスポットが形成される。図 3-7、図 3-8 は、集光角が大きなレンズ (NA=1.2、媒質の屈折率=1.33 (本論文中使用したもの)) にビームが集光したときの、強度分布のシミュレーション結果 (“3-2-2 集光点の光強度分布のシミュレーション”に記述したプログラムを用いた)^(*)を表している。また、集光点における電場ベクトルを光軸方向の電場成分 (E_z) と、横方向の電場成分 (E_r) とで分けて計算した結果も示す。LP ビームの集光においては、焦点面において横方向の電場成分 (E_r) の方が光軸方向の電場成分 (E_z) より強い。一方、RP ビームでは、光軸方向の電場成分 (E_z) の方が強く、その半値全幅は LP ビームの全強度分布の半値全幅よりも小さい (Quabis *et al.*, 2000)。しかしこの場合、横方向の電場成分 (E_r) の寄与も大きく、合計の強度分布では広がり大きなスポットとなってしまう。これに対し、HRP ビームの集光においては、焦点面における強度分布は、ほとんど光軸方向の電場成分 (E_z) から成ることに加え、横方向の電場成分 (E_r) が相対的に弱まり、LP ビームよりも細かい集光スポットが得られる。

(*) 本研究で使⽤した RP ビーム、HRP ビームのシミュレーション結果は、ガウスビームを液晶素子で変換して擬似的に強度分布がラゲールガウス分布となるように近づけた場合の結果を使⽤している (次節で説明)。

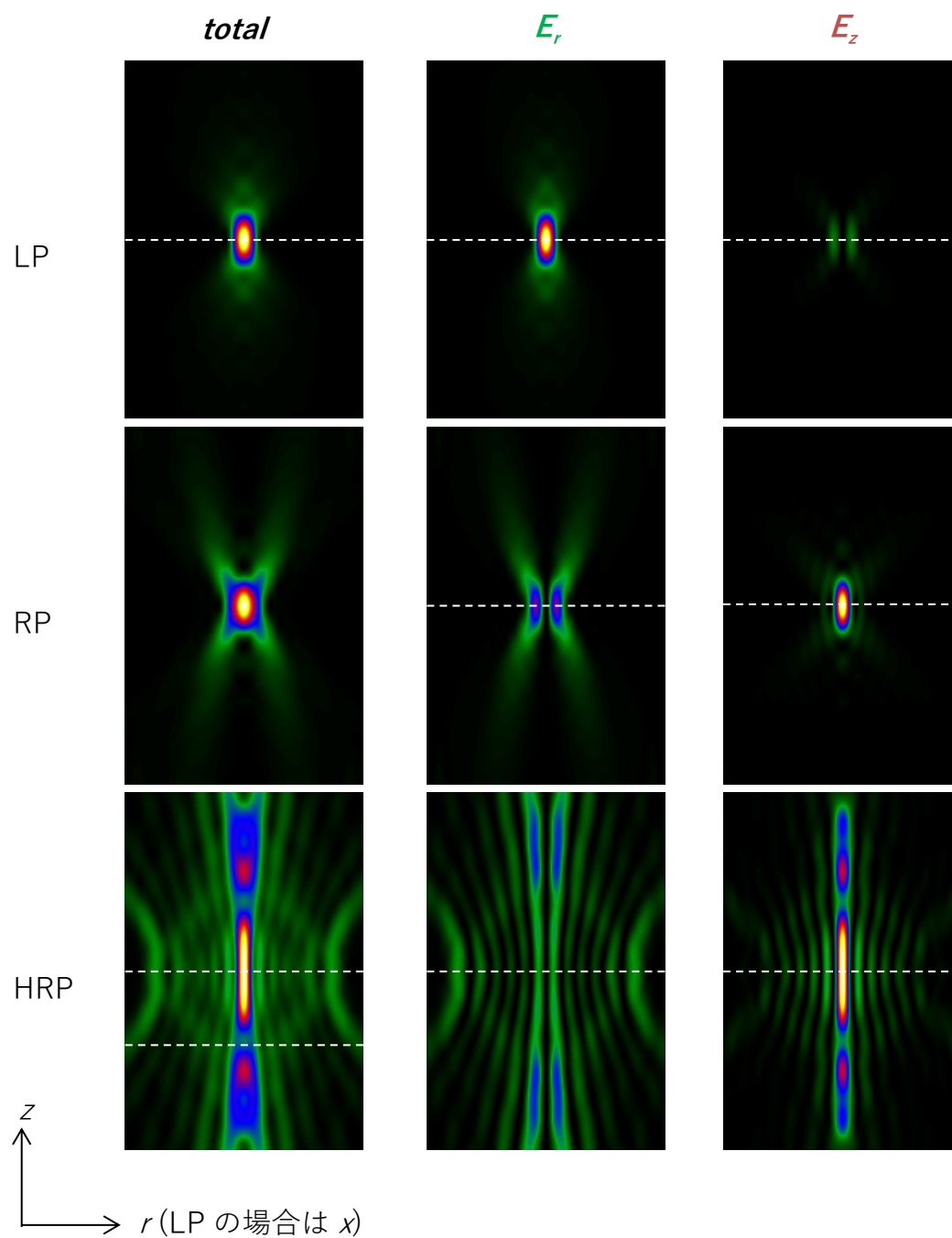


図 3 - 7 焦点付近におけるシミュレーション結果

(NA=1.20、媒質の屈折率 $n=1.33$ 、焦点距離=3 mm) の場合

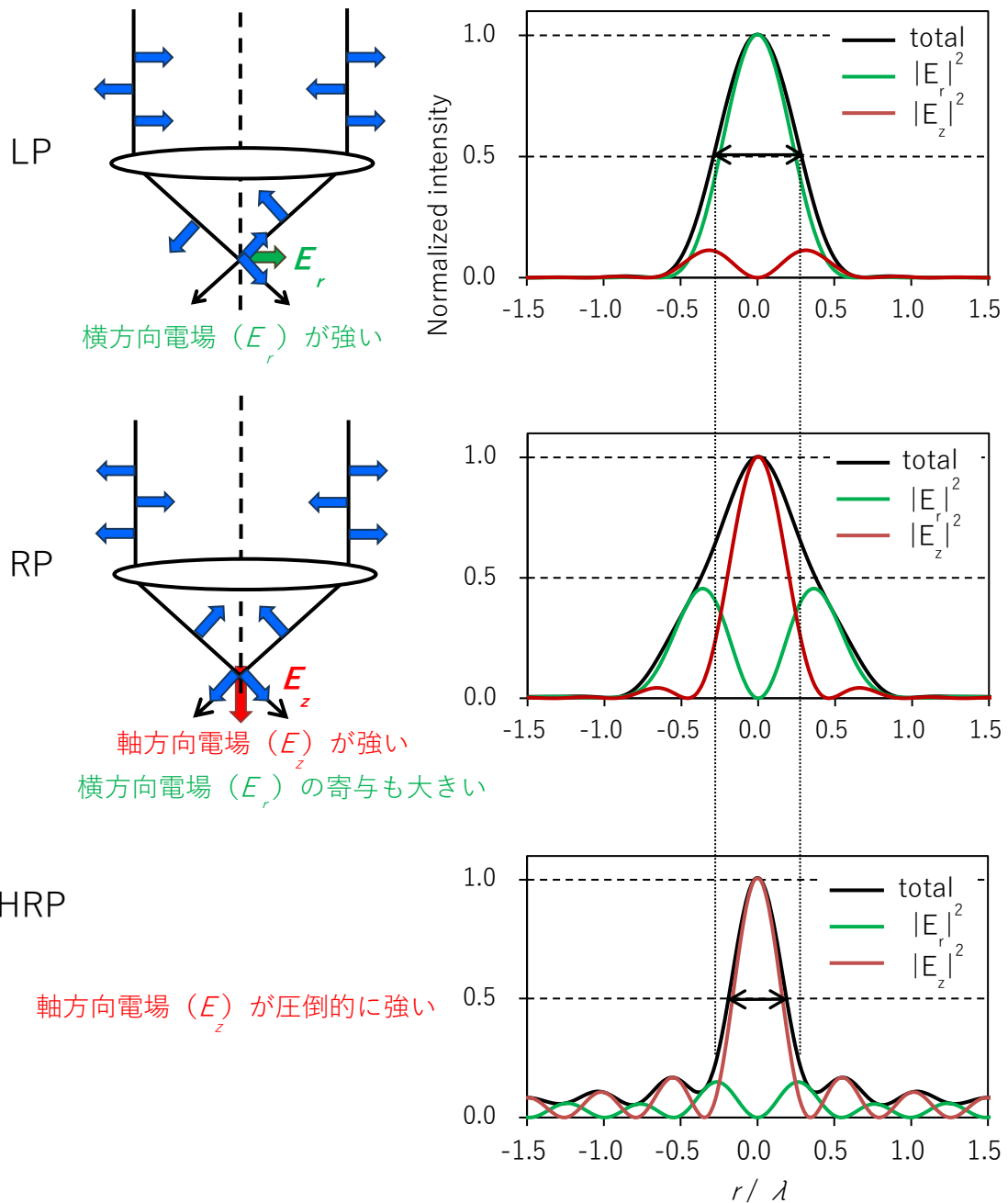


図 3-8 LP、RP、HRP が集光したときの強度分布

焦点における (図 3-2 の白い点線上の) 強度分布を光軸方向の電場成分 (E_z) と、光軸に垂直な方向 (横方向) の電場成分 (E_r) それぞれの強度分布とそれらの Total の強度分布。

(NA=1.20、媒質の屈折率 $n=1.33$ 、焦点距離=3 mm)

3-1-3 HRP ビームの共焦点顕微鏡への応用

レーザーから HRP ビームを直接発生させることは可能であるが、既存のレーザー顕微鏡システムで利用することは、装置の大がかりな改造が必要となり、困難である。そこで当研究室では、通常使用している LP ビームを液晶素子により位相変調することで、擬似的に HRP ビームを生成した。液晶分子は、光学的には単軸結晶として扱うことができ、図 3-9 に示すように各方向に対する屈折率の違いから楕円体として表される（屈折率楕円体）。また、本研究で使用した液晶素子では図 3-10 に示すように、透明電極（ITO：酸化インジウムスズ）がコートされたガラス基盤に液晶分子が一定方向に配置している（このときの x 軸方向を液晶の配向方向という）。透明電極に電圧を印加すると、電場の影響で液晶分子は傾く。

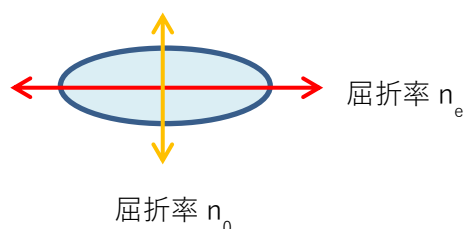


図 3-9 液晶分子

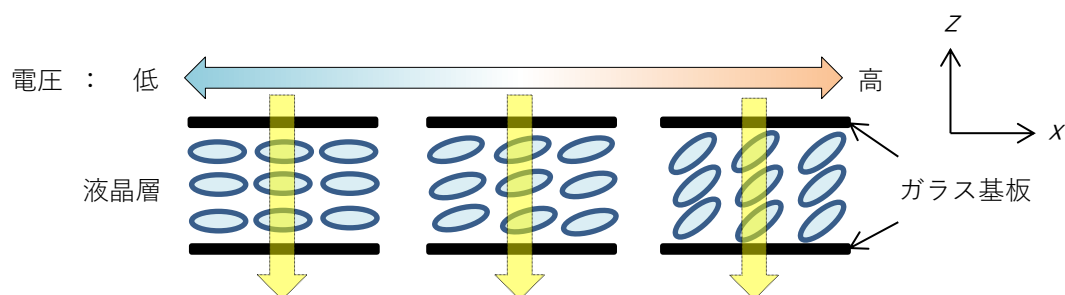


図 3-10 液晶素子

次に、液晶素子への印加電圧値を変化させることにより、偏光方向を変える仕組みについて説明する。図 3 - 1 1 に示すように、 z 方向に入射した光が、 z 軸から x 軸方向へ θ 傾いた液晶分子を通過するとき、光の電場は光軸に垂直な方向の屈折率 n_o と n_p の影響を受ける。このとき n_o は光に対する液晶の傾き θ で変化しないが、 n_p は(3.3)式に示すように液晶の傾き θ で変化する。

$$n_p(\theta) = \frac{n_o n_e}{\sqrt{n_o^2 \cos^2 \theta + n_e^2 \sin^2 \theta}} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot (3.3)$$

例えば、図 3 - 1 2 に示したような x 方向に配向方向をもつ液晶素子に π の位相変調となるように電圧を印加し、 x 偏光の LP ビームを透過させた場合、位相が反転する。 y 偏光の LP ビームを透過させた場合、光路長は液晶分子の傾きに依存しないため、液晶素子に挿入する前後で偏光方向は変わらない。また、図 3 - 1 2 に示すような y 軸から x 軸に角度 ϕ 傾いた方向の偏光の LP ビームを透過させた場合、 x 方向の偏光成分のみ π の位相変調が生じ、偏光方向が y 軸に対して線対称の向きとなる。

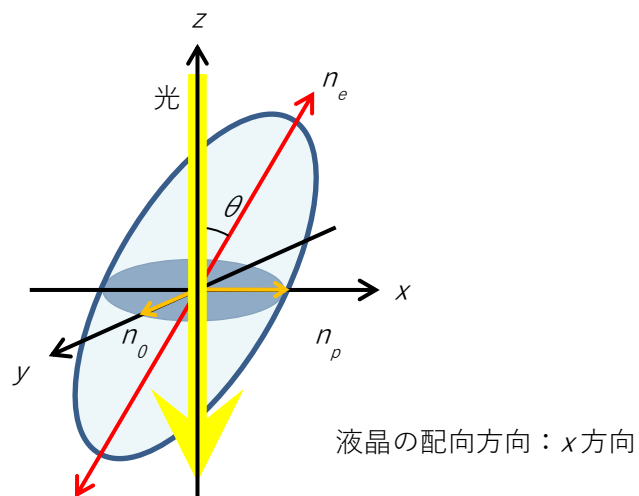


図 3 - 1 1 液晶分子に光を入射したとき

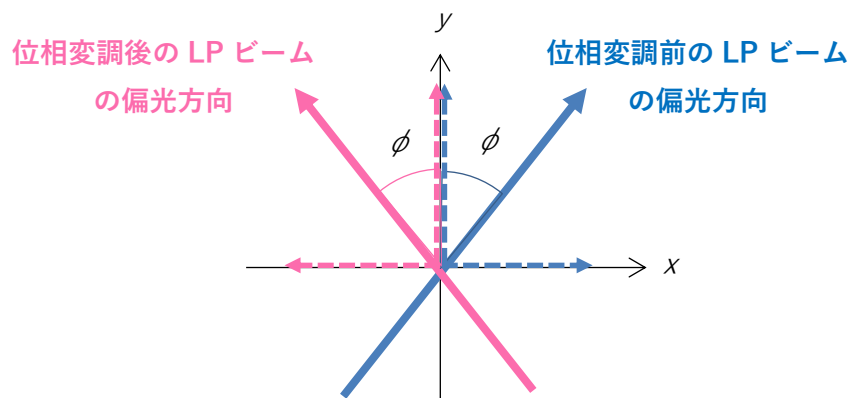


図 3 - 1 2 液晶素子による偏光方向の変調

x 方向に π の位相変調となるように液晶素子（このとき、液晶素子の配向方向は x 方向）に電圧を印加したとき。

LP ビームから HRP ビームに変換するためには、1 対の液晶素子である「6 重リング液晶素子」と「12 分割液晶素子」を使用する。入力ビームには LP ビームを入射する。まず LP ビームを 6 重リング液晶素子に通すことで、リング間で π の位相差を与える。HRP ビームの強度分布は(3.1)式のように示されるため、6 重リング液晶素子の各リング半径は、ラゲールガウス関数の節の位置に対応させるように設計されている。また、この 6 重リング液晶素子は本研究で使用している対物レンズ(UplanSApo 60xW / NA1.20)の瞳径と、バックアパーチャー径を考慮した設計になっている (図 3 - 1 3)。

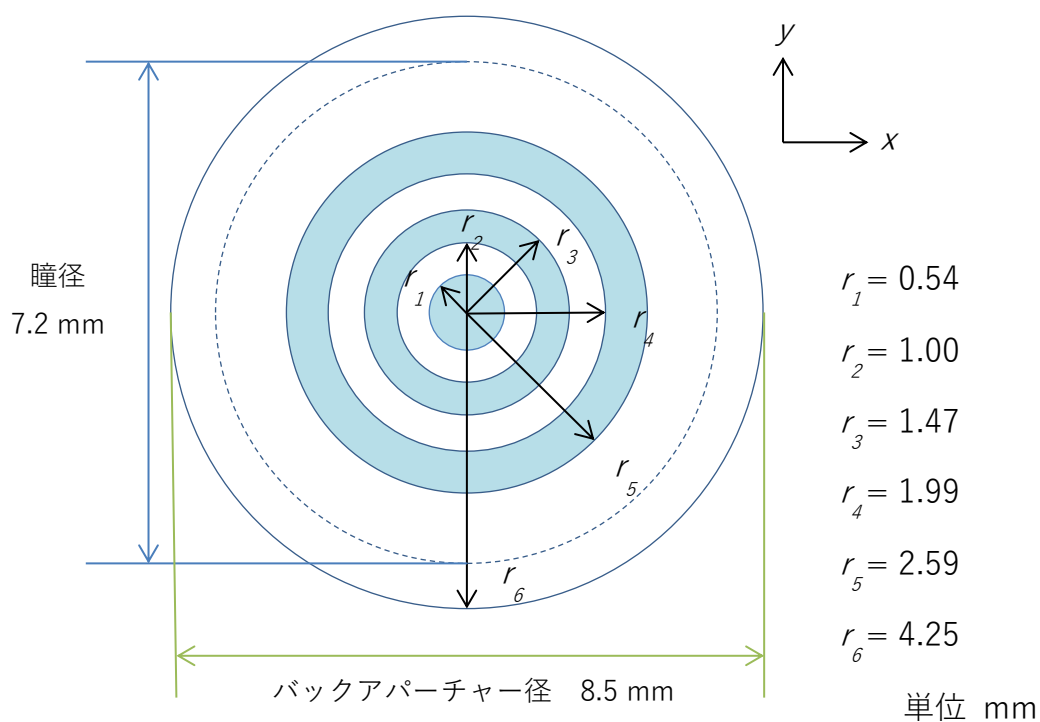


図 3 - 1 3 6 重リング液晶素子の各リングの半径

LP ビームが 6 重リング液晶素子を透過後、12 分割液晶素子を透過することで偏光方向が径偏光に変調され、HRP ビームが生成される。図 3 - 1 4 に示すように 12 分割液晶素子は、中心角 30° の 12 個のセグメントに分けられている。液晶の配向方向は、図中で両矢印で表したように、それぞれのセグメントで 15° ずつ異なり一周で 180° 回る。このそれぞれの液晶素子に π の位相差が生じるように電圧を印加すると、偏光が径方向に回転する。

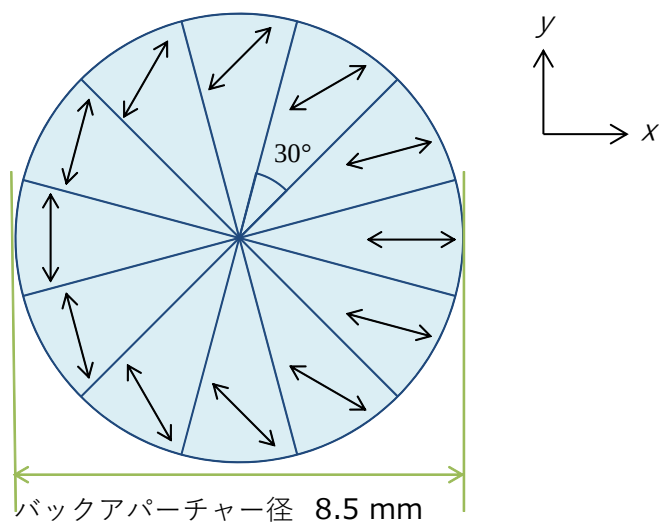


図 3 - 1 4 12 分割液晶素子

当研究室では、この 1 対の液晶素子を共焦点顕微鏡のレボルバーに取付けることで、HRP ビームの生成に成功した(Kozawa *et al.*, 2011)。シミュレーションより、HRP ビームのサイドローブが LP ビームに比べて目立つことが問題であったが、共焦点ピンホールを最適にすることで、サイドローブを除去できた。また、共焦点顕微鏡の空間分解能を評価するために、蛍光ビーズを用いて半値全幅を測定した結果、LP ビームでは $0.270\ \mu\text{m}$ であったのに対し、HRP ビームでは $0.203\ \mu\text{m}$ となり、分解能が向上したことを確認した（励起波長 $473\ \text{nm}$ 時）。更に、この技術を固定細胞サンプルに応用した結果、LP ビームでは解像できない微小な線維が、HRP ビームによって解像された(Kozawa *et al.*, 2011)。

3-1-4 本研究の目的

2光子励起顕微鏡は共焦点顕微鏡よりも生体にとって低侵襲だが、空間分解能は波長に依存して悪くなるので、近赤外光を使用する2光子励起顕微鏡では、可視光を使用する共焦点顕微鏡よりも空間分解能が劣る。本研究では2光子励起顕微鏡のこの欠点を克服するため、HRP ビームによって2光子励起顕微鏡の空間分解能の向上させることを目指す。

まず、シミュレーションより得られた光強度分布(Kozawa *et al.*, 2011)の2乗を計算することで、2光子励起顕微鏡における理論的な強度分布 (PSF : point spread function) を求めた (図 3-15)。シミュレーション結果から得られた半値全幅は、LP ビーム、HRP ビームそれぞれ $0.547 (\lambda_{ex}/n)$ nm、 $0.357 (\lambda_{ex}/n)$ nm (λ_{ex} : 励起波長 (nm), n : 浸液の屈折率) となった。これより、HRP ビームを用いることでLP ビームよりも分解能が向上することが示唆された。そこで本研究では、2光子励起顕微鏡にHRP ビームを応用して空間分解能を向上させ、免疫染色した固定細胞の観察や蛍光タンパク質を利用したライブイメージングにおける高解像化を試みた。

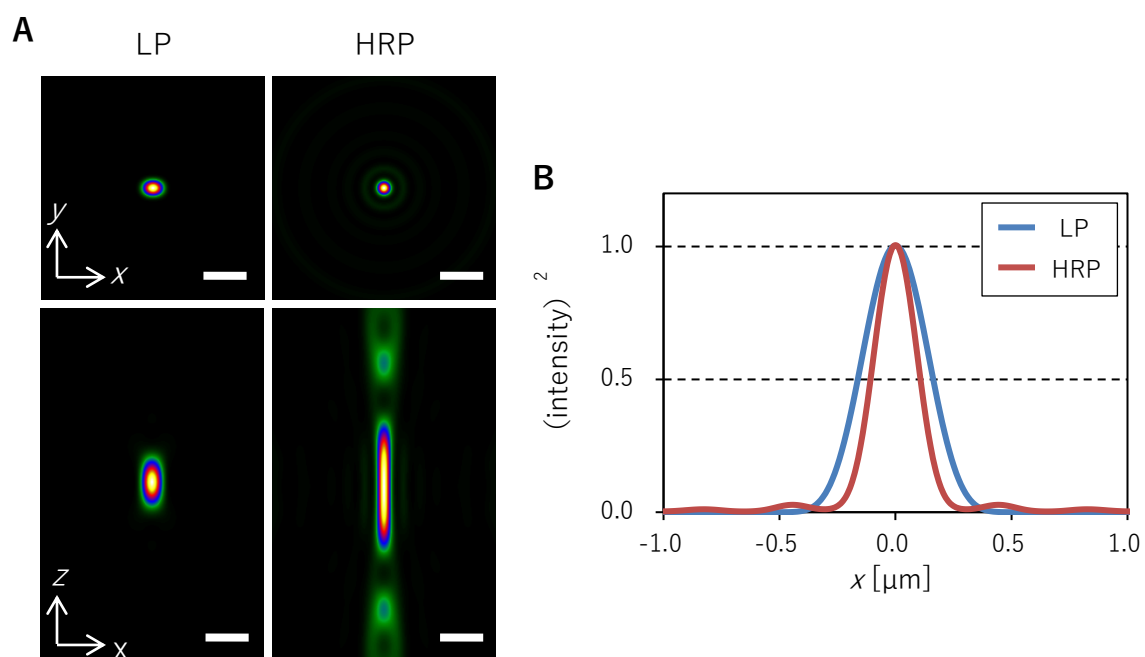


図3－15 強度分布の2乗のシミュレーション結果

スケールバーは $1\ \mu\text{m}$ を示す。

3-2 材料と方法

3-2-1 光路

図3-16(A)は本研究で用いた2光子励起顕微鏡システムを示す。励起光には、フェムト秒の近赤外パルスレーザーであるアクティブモード同期式のチタンサファイアレーザーTsunami (Spectra Physics) を使用した。実験には、800 nm、860 nm、910 nmの波長を使用した。出射ビームは、ネガティブチャープ、パワーコントローラー ($\lambda/2$ 板とグラントムソンプリズム) とビームエキスパンダー (ビーム径を変えるための1対のレンズL1、L2) と偏光板を通る。パワーコントローラーでは、 $\lambda/2$ 板の向きを変えることでレーザーパワーの調整を行った。偏光板は図3-16(B)に示すように、LPビームの偏光方向が観測者に対しステージ上でx方向となるようにした。また、本論文で記述するx方向は全て図3-16(B)に示すx方向を示す。その後、LPビームは、スキャナー(FV1000 MPE, Olympus)を通り、正立型顕微鏡 (BX61WI, Olympus)に入る。LPビームは、対物レンズ(UPlanSApo 60XW, NA 1.20, Olympus)の前に挿入されている1対の液晶素子によってHRPビームに変換される。この1対の液晶素子は、液晶素子ホルダー (東北大学にて製作) に挿入することで、本研究を進めた。

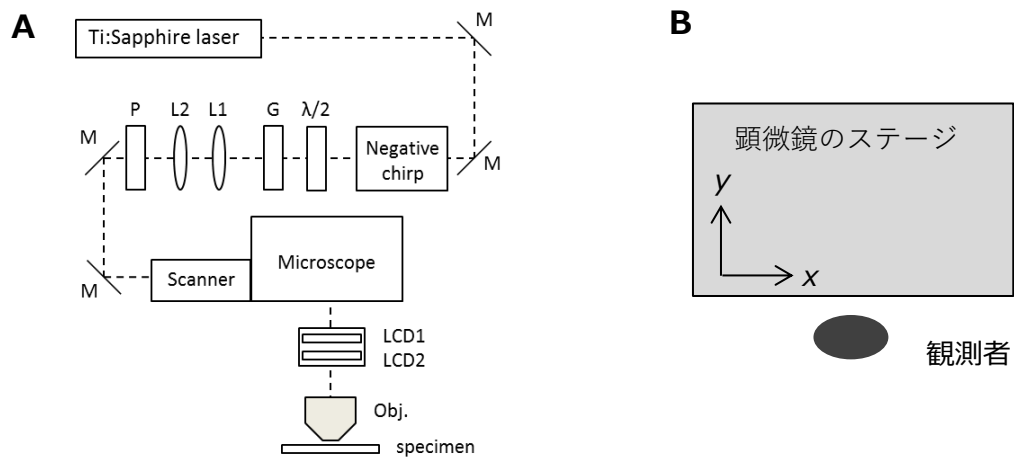
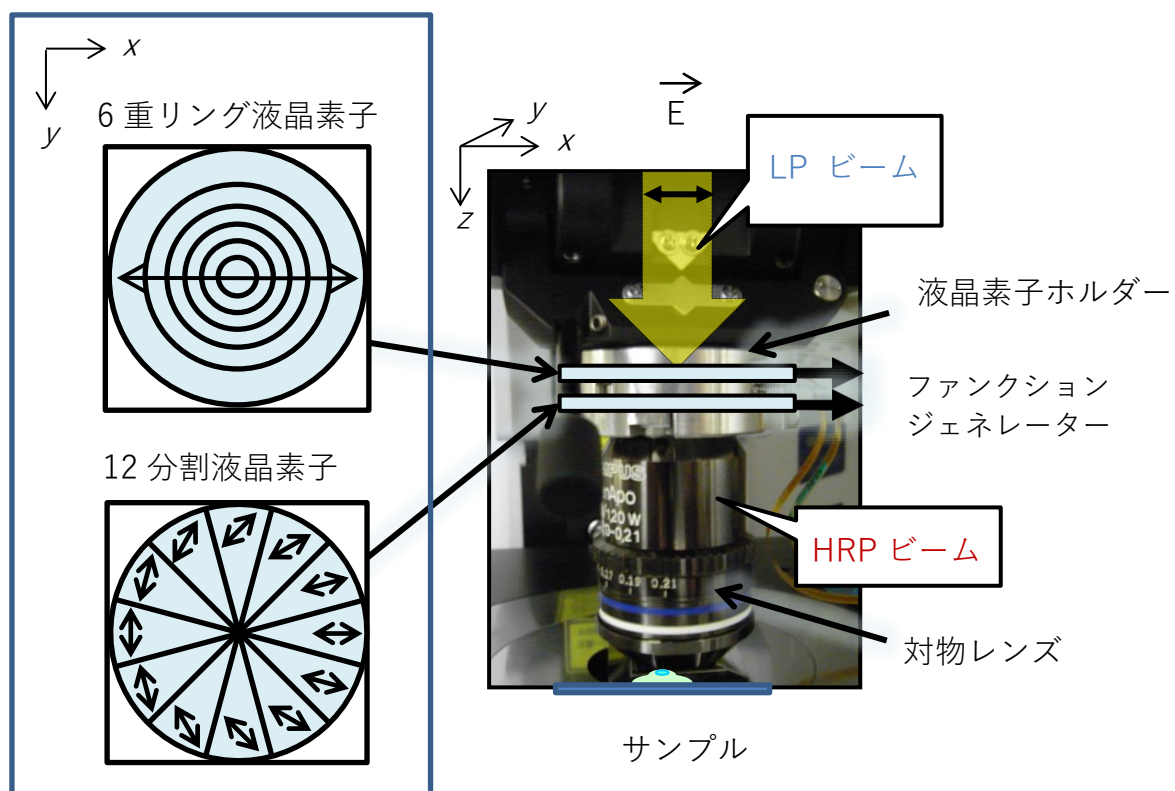


図 3 - 1 6 強度分布の 2 乗のシミュレーション結果

(A) 光路図。Ti:Sapphire laser:チタンサファイアレーザー、M; ミラー、 $\lambda/2$; $\lambda/2$ 板、G; グラントムソンプリズム、L1 & L2; レンズ、P; 偏向板、LCD; 液晶素子、Obj.; 対物レンズ。

(B) 顕微鏡ステージと観測者に対する x 方向の定義

液晶素子の設置方法を図3-17に示した。対物レンズとレボルバーの間に、液晶素子ホルダーを装着し、液晶素子を、以下の通りに適切な向きで液晶素子ホルダーへ挿入した。この時、ファンクションジェネレーターで振動数1 kHz の矩形波を発生させ、それを液晶素子に印加した。



両矢印は、液晶の配向方向を示す。

図3-17 液晶素子と対物レンズの設置

本研究では、ビーム径の調節は図3-16(A)中のビームエキスパンダーの L2 を動かすことにより行った。ビーム径とは、ビーム断面において最大強度の $1/e^2$ となる位置でのビームの直径と定義した。このとき、ビーム径内には全ビーム強度の 86.5%が含まれる。ビームエキスパンダーでは、1 軸方向に動くモータ駆動ステージ (SGSP 20-85, シグマ光機) に L2 が取り付けられており、それに適応したコントローラ (SCT-602, シグマ光機) に表示される値を変えることで、L2 の位置を制御した。図3-18 には、オリンパス社による設定値に基づいて作成した L2 の位置とビーム径 D の関係のグラフと近似直線を示した。この式により各ビーム径になるときの位置を求め、コントローラに設定して使用した。

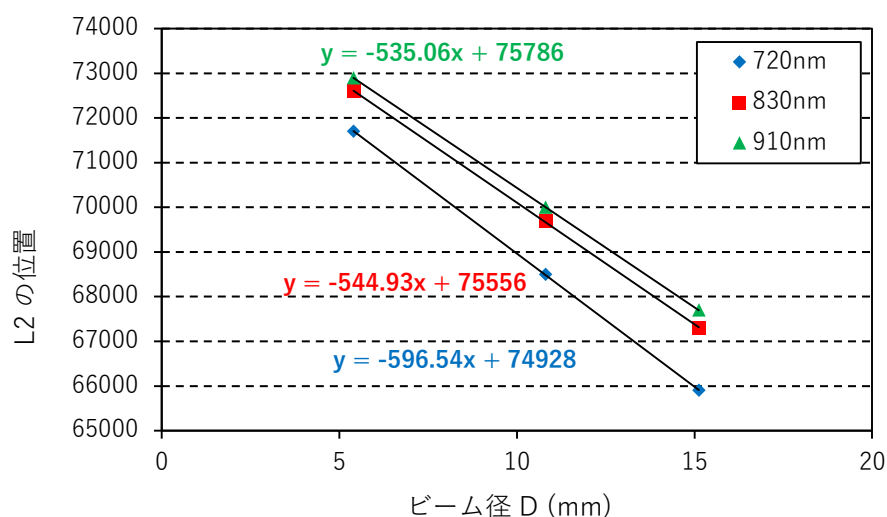


図3-18 L2 の位置とビーム径 D の関係

3-2-2 集光点の光強度分布のシミュレーション

光強度分布のシミュレーションには東北大学多元物質科学研究所の小澤祐市准教授が作成した LGPhaseShifterFocusingGen3_1 を使用し、以下のようにベクトル回折理論により計算された。図 3-19 において、 f を焦点距離、 r をビーム半径とし、瞳半径を r_{max} とすると、RP ビームと HRP ビームの強度分布は、(3.4)、(3.5) 式のようになる (Richards and Wolf, 1959)。

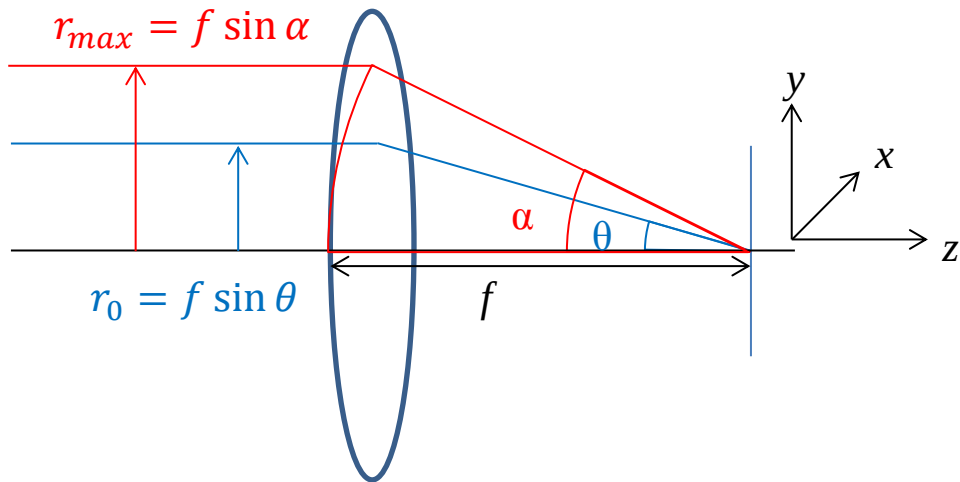


図 3-19 結像光学系におけるレーザービーム高 NA のレンズ

焦点近傍(r, z)での電場 $E =$ (半径方向の電場) $E_r +$ (軸方向電場) $E_z \dots$ (3.4)

$$\left. \begin{aligned} E_r(r, z) &= A \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin(2\theta) P_0(\theta) J_1(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \\ E_z(r, z) &= i2A \int_0^\alpha \sqrt{\cos \theta} \sin^2(\theta) P_0(\theta) J_0(kr \sin \theta) \exp(ikz \cos \theta) d\theta \end{aligned} \right\} (3.5)$$

また、(3.5)式における瞳関数 $P_0(\theta)$ は図 3-13 に示した 6 重リング液晶素子の設計に基づいて、以下のような(3.6)式を用いている。

$$P_0(\theta) = l_0(\theta) \times \begin{cases} 1 & \text{if } 0 < \theta < \sin^{-1}(r_1/fn) \\ e^{i\delta} & \text{if } \sin^{-1}(r_1/fn) < \theta < \sin^{-1}(r_2/fn) \\ 1 & \text{if } \sin^{-1}(r_2/fn) < \theta < \sin^{-1}(r_3/fn) \\ e^{i\delta} & \text{if } \sin^{-1}(r_3/fn) < \theta < \sin^{-1}(r_4/fn) \\ 1 & \text{if } \sin^{-1}(r_4/fn) < \theta < \sin^{-1}(r_5/fn) \\ e^{i\delta} & \text{if } \sin^{-1}(r_5/fn) < \theta < \sin^{-1}(NA/fn) \end{cases} \quad (3.6)$$

$l_0(\theta)$: 入射ビームの振幅 (ガウス分布)

n : 媒質の屈折率 (1.33)

f : 焦点距離 (3 mm)

δ : 位相差

また、本研究では高 NA レンズを使用したため、LP ビームの場合もベクトル回折理論を用いた (Youngworth and Brown, 2000)。

本研究における 2 光子励起顕微鏡における蛍光の理論的な強度分布は光強度分布 (Kozawa *et al.*, 2011) の 2 乗を計算することで得た。入力 LP ビームの強度分布は、ガウス分布であると仮定した。また、簡単のため、放出される蛍光はランダム偏光と仮定した。シミュレーションに用いたパラメータを表 3-1 にまとめた。

表 3 - 1 シミュレーション結果の取得条件

	パラメータ	LP 時	HRP 時
対物レンズ	焦点距離 (mm)	3	
	媒質の屈折率 n	1.33	
	瞳孔径 (mm)	7.2	
	NA	1.2	
画像の取得条件	xy 画像の幅 (μm)	2.56 $\times$ 2.56	
	z 方向の厚み (μm)	10	
6 重リング液晶素子	リング間の位相差	0	π

3-2-3 ビームプロファイラによるビーム強度の観察

液晶素子への駆動電圧の決定は、ビームプロファイラを使ってビームの強度分布を観察しながら行った。図3-17の状態から対物レンズを外し、図3-20に示すように顕微鏡のステージにビームプロファイラを固定し、瞳位置におけるビームの強度分布を観察した。LP ビームと HRP ビームを切り替えるためには、それぞれの励起波長ごとに、液晶素子への最適電圧を決定する必要がある。

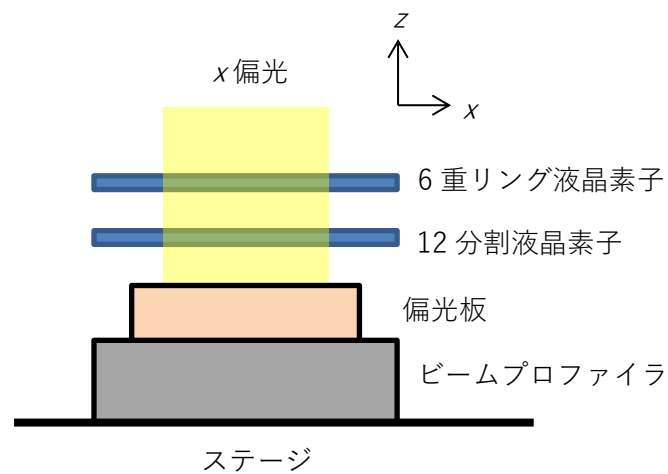


図3-20 ビームプロファイラのセッティング

<12 分割液晶素子への駆動電圧の決定>

ビームプロファイラの上に、 x 方向の偏光が通るように偏光板を置き、液晶素子と偏光板を通過した後のビーム強度を観察することで、ビームの偏光方向を確認した。このとき 6 重リング液晶素子への電圧は off に設定した。液晶素子への印加電圧を変化させていくと、ビームの強度分布は全てのセグメントで均一な明るさの分布と、 x 方向のセグメントが明るく y 方向のセグメントが暗い分布を交互に繰り返した。均一な明るさのときは全てのセグメントで x 偏光であることを意味するので、このときの電圧値を LP ビーム使用時の最適電圧とした。また、 x 方向のセグメントが明るく y 方向のセグメントが暗いとき、 x 方向のセグメントでは x 偏光、 y 方向のセグメントでは y 偏光であることを意味するので、このときの電圧値を、HRP ビーム使用時の最適電圧とした（図 3 - 2 1）。

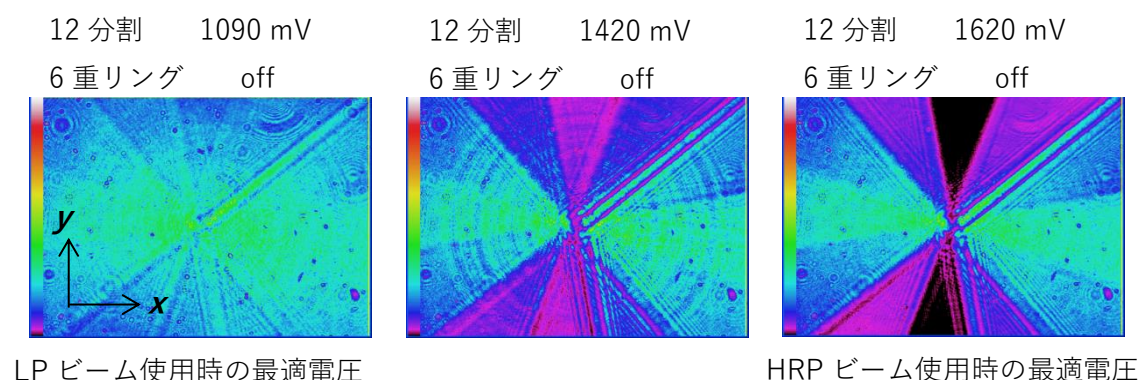


図 3 - 2 1 12 分割液晶素子への電圧値を変化させたときの強度分布
(励起波長 750nm 時)

<6重リング液晶素子への駆動電圧決定>

図3-20のセッティングからビームプロファイラの上の偏光板を取り除き、6重リング液晶素子に電圧を印加した。このとき、12分割液晶素子には上で求めたLPビームを出力するための最適電圧を印加した。6重リングへの印加電圧を変化させていくと、均一な明るさの分布とリング毎のコントラストが強く現れる分布を交互に繰り返した。均一な明るさの分布は、リング毎の位相差が0のときを示し、リング毎のコントラストが最も強く現れるときはリング毎で π の位相差が生じていることを示すので、このときの電圧値をHRPビーム使用時の暫定の印加電圧とした(図3-22)。

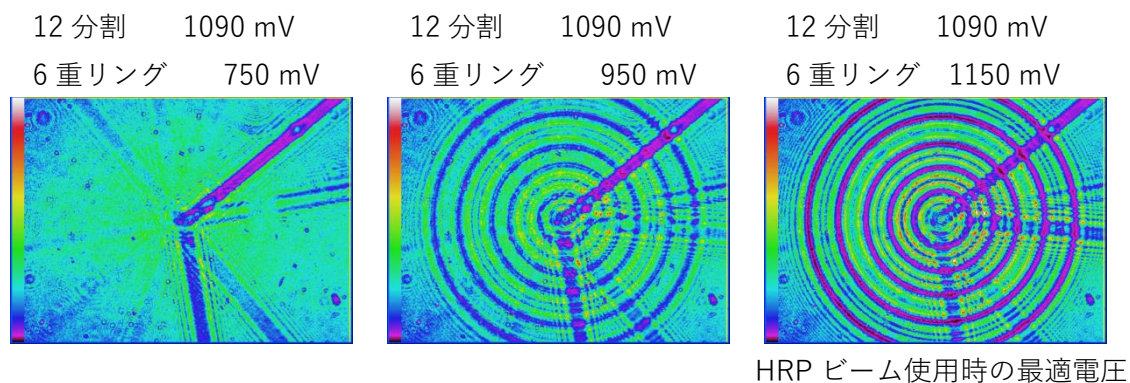


図3-22 6重リング液晶素子への電圧値を変化させたときの強度分布
(励起波長 750nm 時)

3-2-4 蛍光ビーズのサンプル作製

蛍光ビーズは直径 $0.17\mu\text{m}$ または $0.2\mu\text{m}$ (Invitrogen) を用い、希釈して使用した。

<アガロースに包埋した蛍光ビーズサンプルの場合>

最初に、スライドガラスの上に Slide Seal (TaKaRa) をのせた。1%アガロース L (Wako) に蛍光ビーズを混ぜたものを Slide Seal のフレームの中に注ぎ、その後、No.1S のカバーガラス (松浪硝子) を Slide Seal の上にかぶせた (図 3-2 3)。

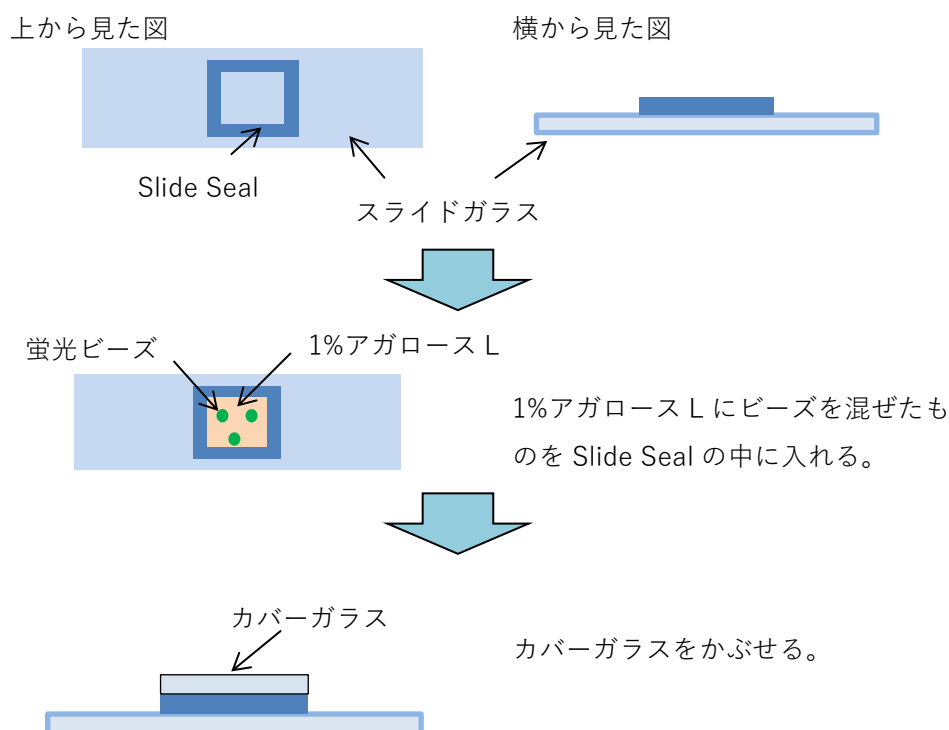


図 3-2 3 アガロースに包埋した蛍光ビーズのサンプル作製

＜ガラス－水界面上の蛍光ビーズサンプルの場合＞

蛍光ビーズを、MilliQ で希釈し、この懸濁液を少量、No.1S のカバーガラス（松浪硝子）の上に滴下し、乾燥させた。スライドガラスに MilliQ を滴下し、蛍光ビーズを付着させたカバーガラスを蛍光ビーズの付着面が内側になるようにのせた。カバーガラスの周囲ににじみ出した余分な MilliQ を取り除いた後、マニキュアでシーリングした。

3-2-5 蛍光ビーズ画像からの分解能の測定方法

顕微鏡の分解能を評価するため、直径 $0.17 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを用い、以下の方法により平均蛍光強度のプロファイルの半値全幅を測定した。

- (1) まず 10 個の孤立した蛍光ビーズ像を取得した。xyz 画像においてビーズの中心で最も高い蛍光強度をもつ xy、xz 面を選び、その面を測定面とした。
- (2) xy 測定面、xz 測定面それぞれから、ビーズの中心で最も高い蛍光強度を通るように x 方向、z 方向に線をひき、その線上の強度プロファイルを取得した。
- (3) バックグラウンドは、測定面上のシグナルが無い領域における平均強度とした。それを、強度プロファイルから減算した。
- (4) 続いて、Origin software (OriginLab) を使用し、測定した強度分布を(3.7)式で表したガウス関数でフィッティングすることにより、最大強度と中心位置を決定した。

$$I = A \exp\left(\frac{-2 \ln 4(x-B)^2}{C^2}\right) + D \quad \cdot \cdot \cdot \cdot (3.7)$$

A：最大強度値、B：中心位置、C：半値全幅、D：バックグラウンド

- (5) 10 個のビーズから得られたそれぞれの強度プロファイルは得られた最大強度 A で規格化して、中心位置 B が 0 になるように位置を揃え、その強度プロファイルを平均し、平均プロファイルを求めた。平均プロファイルの最大値で再び規格化して示した。
- (6) 最大強度の半分の値をまたぐ 2 か所で、その値の前後 6 点の強度を用いて最小二乗法により直線を求め、最大強度の半分の値となる位置を求めた。その 2 点間の距離を平均強度プロファイルの半値全幅の値とした。

3-2-6 固定細胞のサンプル作製

固定細胞の観察には、COS-7 細胞を用いた。60 mm dish 内に、70%エタノールに浸した後に乾燥させたカバーガラスを入れ、そこに COS-7 細胞を播いた。培地には 10% FBS (Invitrogen)、100 unit/ml penicillin と 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen)、4 mM の L-グルタミン、15 mg/ml のフェノールレッドを含有する DMEM (Wako)を用い、37° C、5% CO₂内で培養した。カバーガラス上で培養した COS-7 細胞を、4%ホルムアルデヒド in PBS で固定した後、0.3% TritonX-100 in PBS を用いて透過処理を行った。免疫染色には、1 次抗体はマウス抗 α -tubulin モノクローナル抗体 (clone DM1A, Cell Signaling)を使用し、2 次抗体はそれぞれ AlexaFluor405、AlexaFluor488、AlexaFluor546 が結合したヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体(Invitrogen)を用いた。1 次抗体、2 次抗体は、0.5% Tween 20 in PBS で 400 倍希釈して使用した。サンプルの封入には、スライドガラス (S2441, 松浪硝子) の上に MilliQ 滴下し、その上から細胞が接着している面を内側にしてカバーガラスをかぶせ、マニキュアでシーリングした。

3-2-7 生細胞のサンプル作製

Lifeact (Riedl *et al.*, 2008) と mTFP1 (Ai *et al.*, 2006) の融合タンパクを発現するプラスミドを以下のように作製した。mTFP1 の発現プラスミドである NE-mTFP1-NC (当研究室にて作製) を制限酵素 *NheI* と *BamHI* により切断し、電気泳動後ゲルを切り出し、Nucleo Spin Extract II (MACHEREY-NAGEL) で DNA を抽出した。また、Lifeact をコードする DNA のセンス鎖とアンチセンス鎖は等量混合し、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice, TaKaRa) にて 95°C、5 min 熱処理後、急冷した。

Lifeact をコードする DNA フラグメントとして以下の合成 DNA を用いた。

(センス鎖)

CTAGCATGGGTGTCGCAGATTTGATCAAGAAATTCGAAAGCATCTCA

AAGGAAGAAG

(アンチセンス鎖)

GATCCTTCTTCCTTTGAGATGCTTTCGAATTTCTTGATCAAATCTGCG

ACACCCATG である。

(末端は、*NheI* と *BamHI* の制限酵素で切断したのと同じ形になっている。)

ベクター側の DNA と Lifeact をコードする DNA を 1:100 のモル比で混ぜ、Ligation high (東洋紡)を使ってライゲーションした後、大腸菌にトランスフォームすることにより得られたコロニーを培養し、NucleoSpin Plasmid QuickPure (MACHERY-NAGEL)を使ってプラスミドを抽出した。目的とする DNA を得られていることは、配列を読むことによって確認した。

上記のようにして得られたプラスミドを、Pure Yield Plasmid Midiprep System (promega)を使って抽出・精製し、ガラスボトムディッシュ上に播いた COS-7 細胞に FuGENE HD (Promega)を使ってトランスフェクションした。2 日間培養した後、培地をすべて取り除き、ガラスボトムディッシュの中央部にフェノールレッドを含まない DMEM (Wako)を滴下し、その上にカバーガラスをかぶせ、歯科用セメント (ジーシーユニファスト、ジーシー) で周囲を固定した。観察時には、ガラスボトムディッシュの底面を上にして、観察を行った。

3-2-8 生細胞の観察画像からの分解能の推定

生細胞を観察した画像の分解能を推定するため、タイムラプスイメージの最初の画像(図 3-30 (B)の 0 min)から LP、HRP ビームそれぞれの画像よりフィロポディア先端部分の強度分布を取得した。強度分布は、フィロポディアの方向と垂直になるように線をひき、その線上の強度分布を取得した。得られた強度分布について Origin software (OriginLab)を使用して(3.7)式に示したガウス関数でフィッティングすることにより、LP、HRP ビームそれぞれの強度分布の最大強度、中心位置、バックグラウンド、半値全幅を取得した。測定した強度プロファイルから、バックグラウンド D を減算し、最大強度 A で規格化し、中心 B を 0 に揃えた。

3-3 結果

3-3-1 シミュレーションによる PSF の推定

2 光子励起時の LP ビーム、HRP ビームそれぞれの理論的な PSF を調べるため、シミュレーションを使って集光点の強度分布の 2 乗の値を計算した。LP ビームでは、 xy 焦点面における集光パターンは y 方向に比べると、わずかに x 方向に伸びていた (図 3-24、A)。LP ビームに x 方向と y 方向における FWHM はそれぞれ、 $0.547 (\lambda_{ex}/n)$ 、 $0.416 (\lambda_{ex}/n)$ だった (λ_{ex} は励起波長、 n は対物レンズと焦点位置の間を満たす媒体の屈折率)。対照的に、HRP ビームで計算された xy 焦点面における集光パターンは軸対称であり、FWHM は、 $0.357 (\lambda_{ex}/n)$ だった (図 3-24、B)。これらの LP ビームと HRP ビームの FWHM の値から、HRP ビームを集光することによって xy 焦点面における分解能が向上することが理論的に示された。 z 方向において、HRP ビームによる PSF はかなり伸びたパターンになった。 z 方向における LP ビームと HRP ビームによるシミュレーション結果から、FWHM はそれぞれ、 $1.186 (\lambda_{ex}/n)$ 、 $3.787 (\lambda_{ex}/n)$ となった (図 3-24、C)。従って、2 光子顕微鏡において HRP ビームを集光すると、 xy 焦点面における高い分解能と深い被写界深度が得られることが理論的に示された。

3-3-2 ビーズサンプルの観察

2光子励起顕微鏡において HRP ビームによる分解能向上を実験的に確認するため、当研究室で開発した LP ビームを HRP ビームに変換できる液晶素子を顕微鏡の対物レンズの直前のレボルバーに取り付けた。そして、アガロースに包埋された直径 $0.170\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを用いて、 $800\ \text{nm}$ の励起により蛍光の強度分布を得ることにより、FWHM を測定した (図 3-24、D-F)。LP ビームにおける FWHM は x 軸、 y 軸それぞれ $294\ \text{nm}$ 、 $260\ \text{nm}$ だった。わずかに偏向方向である x 方向に伸びていることを確認できた。HRP ビームにおいて、焦点面における強度分布はほとんど軸対称であり、FWHM は x 軸、 y 軸それぞれ $0.230\ \mu\text{m}$ 、 $0.231\ \mu\text{m}$ であった。更に、HRP ビームにおける被写界深度は、LP ビームと比べて、かなり深かった ($0.916\ \mu\text{m}$ (LP)、 $3.793\ \mu\text{m}$ (HRP))。また、実測結果の方がシミュレーション結果よりもわずかに z 方向に少し長くなった。HRP ビームにおける z 方向の伸びは、分解能が悪いことを意味するが、HRP ビームにより被写界深度が深い画像を取得することができるという解釈もできる。これらの結果から、シミュレーションと同様に、HRP ビームによって xy 面の分解能は向上し、被写界深度が深くなることを確認できた。

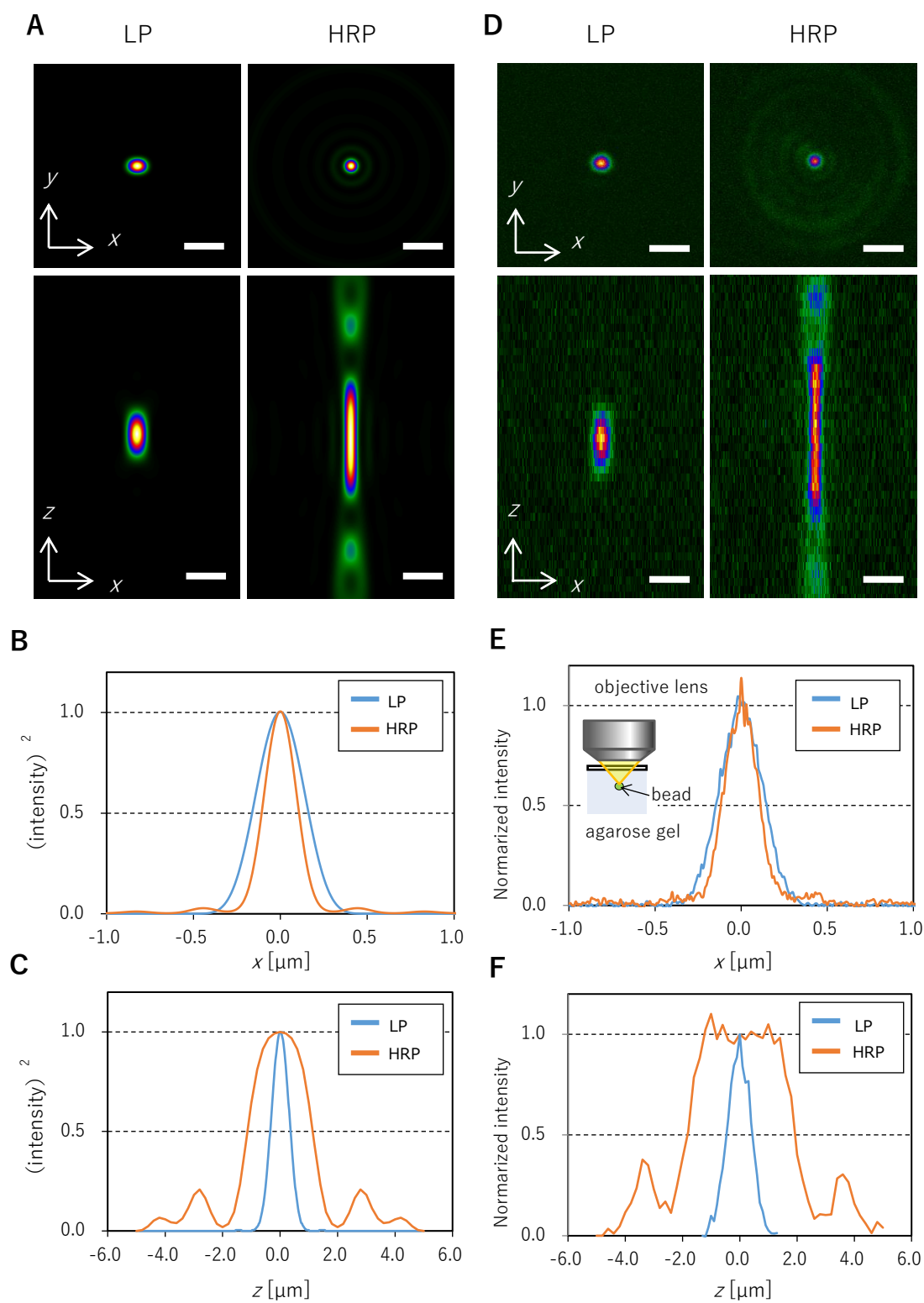


図 3 - 2 4 2 光子励起における集光点の強度分布

(A-C) 励起波長 800 nm で LP、HRP ビームを使用した場合の x - y 焦点面 ($z = 0$) と x - z 焦点面 ($y = 0$) における強度分布のシミュレーション結果。(A) それぞれの焦点面における強度分布を示す。(B) A の x - y 焦点面 において中心を通るように x 方向に引いた線上の強度分布のプロファイル結果。(C) A の x - z 焦点面 において中心を通るように z 方向に引いた線上の強度分布のプロファイル結果。(D-F) 励起波長 800 nm でアガロースに包埋された $0.17 \mu\text{m}$ のビーズを LP、HRP ビームでそれぞれ観察した結果。(D) それぞれの焦点面における強度分布を示す。(E) E の x - y 焦点面 において中心を通るように x 方向に引いた線上の強度分布のプロファイル結果。(F) F の x - z 焦点面 において中心を通るように z 方向に引いた線上の強度分布のプロファイル結果。

次に 800 nm の励起により、ガラス-水界面上の直径 $0.17\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを LP ビーム、HRP ビームで観察し PSF を測定した。LP ビーム、HRP ビームそれぞれの集光パターンを図 3-25 (A) に示した。 x - y 焦点面における焦点パターンは、アガロースに包埋された蛍光ビーズを観察したときと比較すると、LP ビームでは x 方向に更に伸びた形になったのに対し、HRP ビームでは同様に軸対称になった。 x 方向の半値全幅は、LP ビームでは $0.510\ \mu\text{m}$ 、HRP ビームでは $0.188\ \mu\text{m}$ となった (図 3-25、B)。アガロースに包埋された蛍光ビーズを観察したときの結果よりも LP ビームでは分解能が悪くなり、HRP ビームでは分解能が向上する結果となった。この現象は、高屈折率の媒質から低屈折率の媒質に光が入射し、その界面で光が集光する時、光軸方向の電場成分が増強することが理論的にわかっており、そのためだと考えられる。実際に光軸方向の電場成分が強い RP ビームを界面で集光することで、更に分解能が向上するという報告がある (Quabis *et al.*, 2000; Dehez *et al.*, 2009)。そのため集光時に光軸方向の電場成分が強い HRP ビームについても同様の現象だと考えられる。これにより、HRP ビームのガラス-水界面による有用性が示された。これらの結果より、2 光子顕微鏡において HRP ビームで観察するとき、ガラス界面上のサンプル、例えば、カバーガラス上の培養細胞や組織表面を観察するときに、より高い分解能で低いレーザーパワーで観察することが可能であることがわかった。

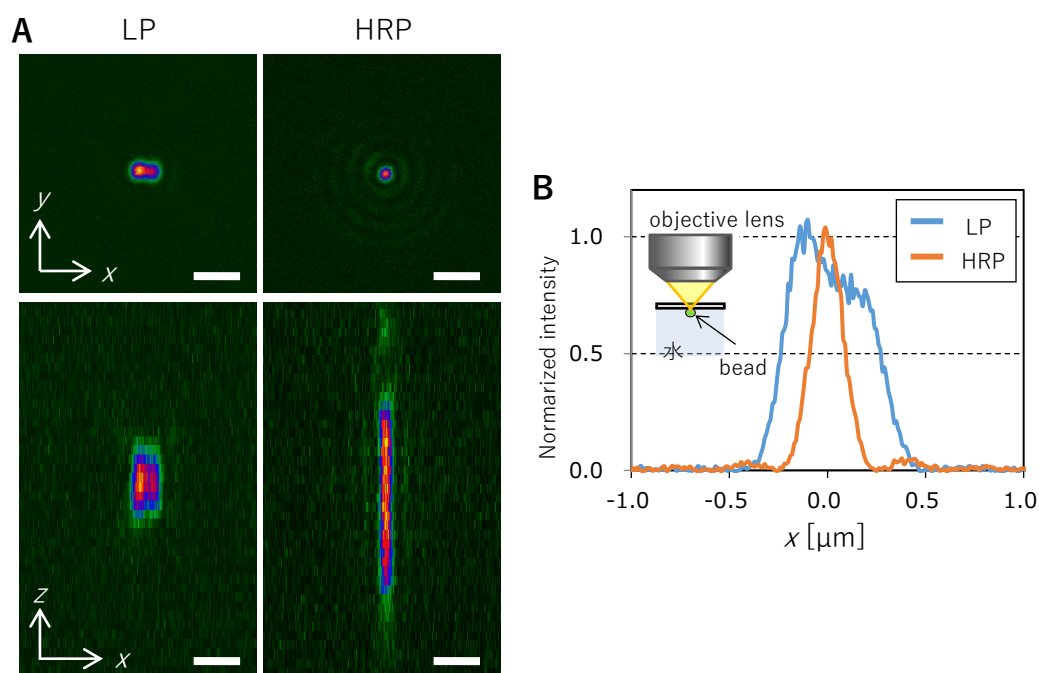


図 3-25 ガラス-水界面における蛍光ビーズの観察結果

(A, B) 励起波長 800 nm でにガラス-水界面上の $0.17\mu\text{m}$ の蛍光ビーズを LP、HRP ビームでそれぞれ観察した結果。(A) x - y 焦点面 ($z=0$) と x - z 焦点面 ($y=0$) における強度分布を示す。スケールバーは $1\mu\text{m}$ を示す。(B) A の x - y 焦点面 において中心を通るように x 方向に引いた線上の強度分布のプロファイル結果。

表 3-2 x 方向の FWHM の測定結果

	$\text{FWHM}_{\text{LP}}(\mu\text{m})$	$\text{FWHM}_{\text{HRP}}(\mu\text{m})$
シミュレーション結果	0.319	0.214
アガロースビーズ	0.294	0.230
ガラス-水界面ビーズ	0.510	0.188

表 3-3 z 方向の半値全幅 (FWHM) の測定結果

	$\text{FWHM}_{\text{LP}}(\mu\text{m})$	$\text{FWHM}_{\text{HRP}}(\mu\text{m})$
シミュレーション結果	0.713	0.228
アガロースビーズ	0.916	3.793

次に、HRP ビームの分解能向上の効果を確かめるため、ガラス－水界面上の直径 $0.2\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを観察した。画像取得時には蛍光ビーズが凝集した視野を選択し、LP ビーム、HRP ビームそれぞれにおいて同視野を観察した（図 3－26）。LP ビームでは、大きな塊のようにみえていたが、HRP ビームを用いることで、ビーズが観察できるようになった。この結果から、HRP ビームによって、 $0.2\ \mu\text{m}$ 程度まで分解能が向上したことが示された。

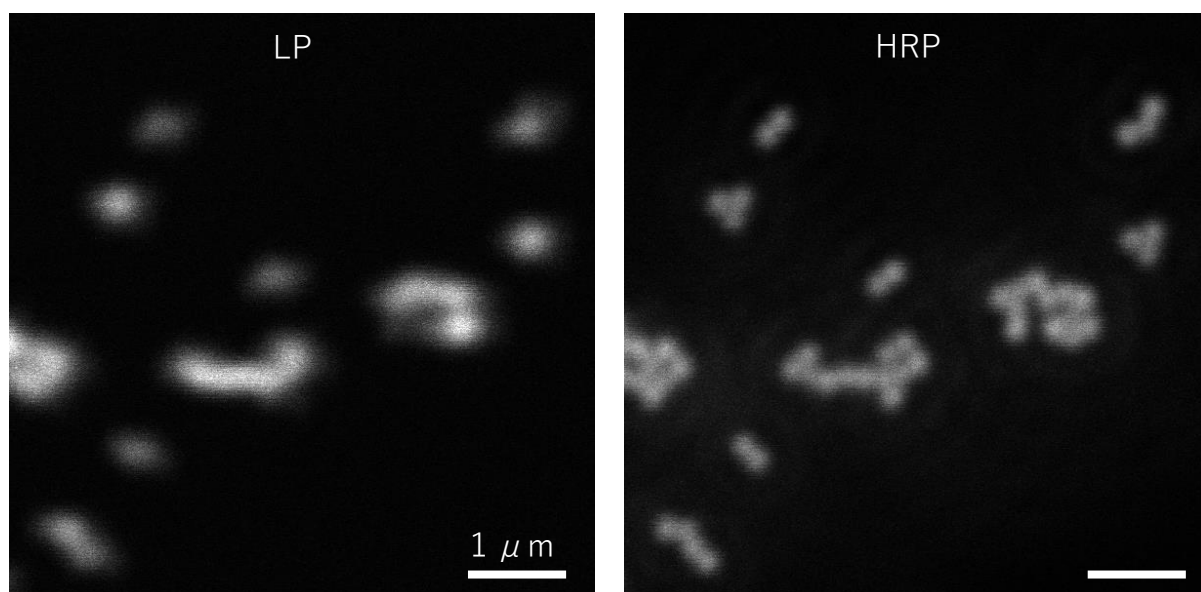


図 3－26 ガラス－水界面における凝集したビーズの観察。

ガラス－水界面において直径 $0.2\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを、LP ビーム（左）と、HRP ビーム（右）によって同じ視野を観察した結果。励起波長は $800\ \text{nm}$ を使用した。

次に、アガロースに包埋された直径 $0.17\ \mu\text{m}$ の蛍光ビーズを $910\ \text{nm}$ の励起により LP、HRP ビームそれぞれで観察した (図 3 - 2 7)。 z 方向に $0.5\ \mu\text{m}$ 間隔で動かしながら、 xy 画像を合計 18 枚取得することで、厚さ $8.5\ \mu\text{m}$ の 3 次元画像を取得した。深い被写界深度をもつ HRP ビームでは、1 枚の画像で観察できたビーズの数が、LP ビームの画像よりも多かった。特に図 3 - 2 7 (B) における HRP ビームの②の画像は、max projection 画像である (A) と似たような画像になっており、この厚さに含まれるほぼ全てのビーズを 1 枚の xy 画像で観察することができたことを示している。以上の結果から、HRP ビームを使うことで深い被写界深度が達成されたことが実証された。

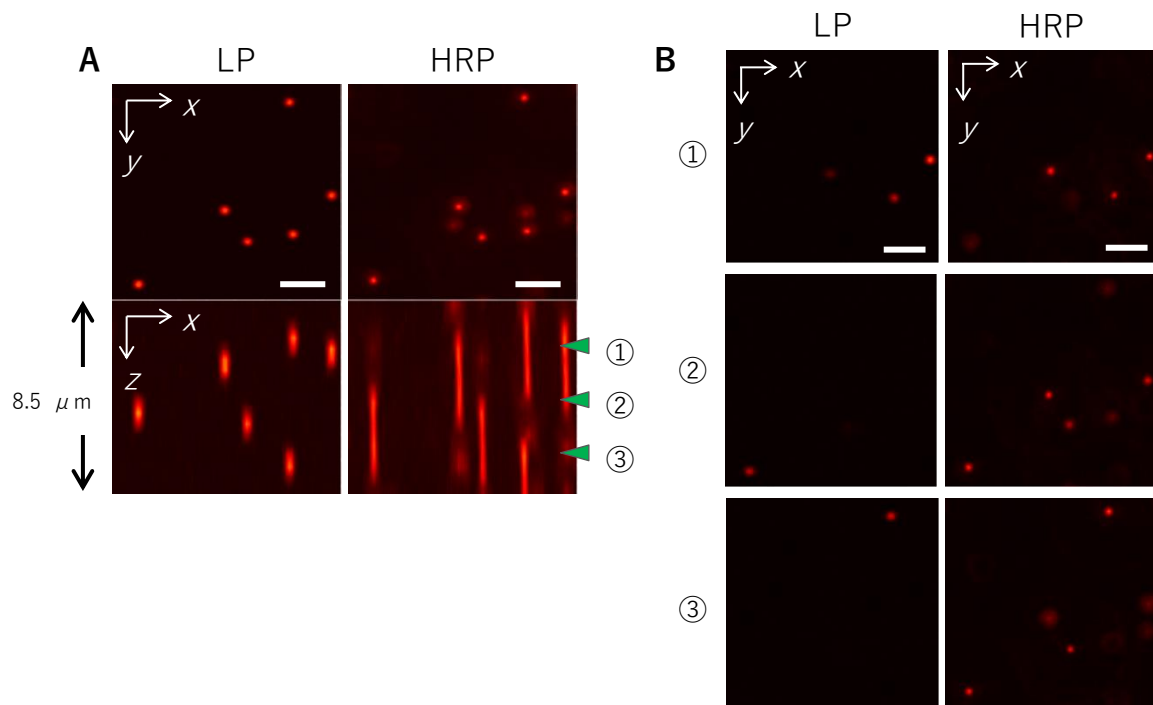


図 3 - 2 7 HRP ビームの深い被写界深度

励起波長 800 nm でアガロースゲル中の 0.17 μm の蛍光ビーズを LP、 HRP ビームでそれぞれ観察した結果。(A) xy 面、 xz 面の max projection 画像 (3 次元画像の、ある方向の面に最大輝度を投影した画像) を示す。 z 方向に 0.5 μm 間隔で動かしながら、 xy 画像を合計 18 枚取得することで、厚さ 8.5 μm の 3 次元画像を取得。取得した全 18 枚の xy 画像のうち①は 5 枚目、②は 10 枚目、③は 15 枚目の位置を示す。(B) A の各深さ①、②、③における xy 画像を示す。スケールバーは 1 μm を示す。

3-3-3 固定細胞の観察

次に HRP ビームが生物サンプルに適用できることを確認するため、ガラス-水界面上の固定 COS-7 細胞の微小管を観察した。Alexa Fluor 546 により染色を行ったサンプルに対し、励起波長 800 nm で LP、HRP ビームそれぞれで同視野を観察した結果、LP ビームでは解像できなかった微細な構造が、HRP ビームを用いることにより解像できるようになった (図 3-28)。更に、別の蛍光色素である、Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 488 を使って染色した COS-7 細胞の微小管を観察した結果、同様に HRP ビームによって LP ビームよりも高分解能に観察することができた (図 3-29、A-D)。更に、Alexa Fluor 546 により染色し、910 nm の励起により観察した結果、励起波長を変えても HRP ビームによって高分解像に観察することができた (図 3-29、E, F)。これらの結果より、多様な蛍光色素を用いて観察を行った場合においても、同様に HRP ビームによって分解能が向上することが示された。HRP ビームによる高分解像技術は、ローカリゼーション法や STED 法などの超解像顕微鏡とは異なり、蛍光色素に特別な制限がなく、様々な蛍光色素で染色したサンプルに利用できることを実証した。

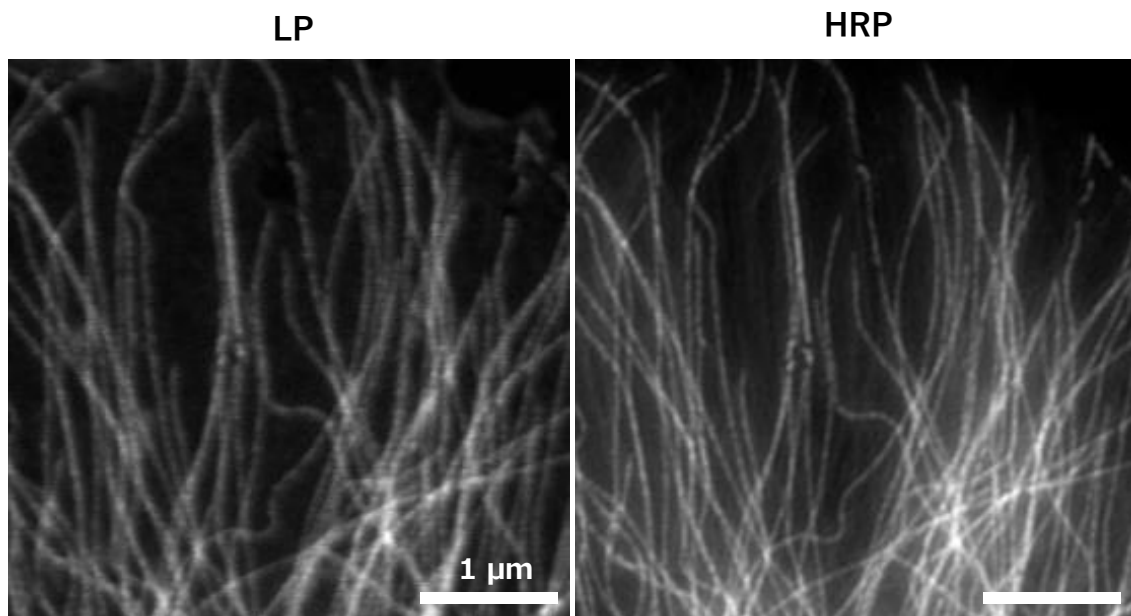


図 3 - 2 8 ガラス-水界面上の COS-7 細胞の微小管

LP ビーム（左）と HRP ビーム（右）を使って同じ視野を観察した結果。この固定 COS-7 細胞の微小管は、Alexa Fluor 546 で染色されており、800 nm の励起波長で観察が行われた。

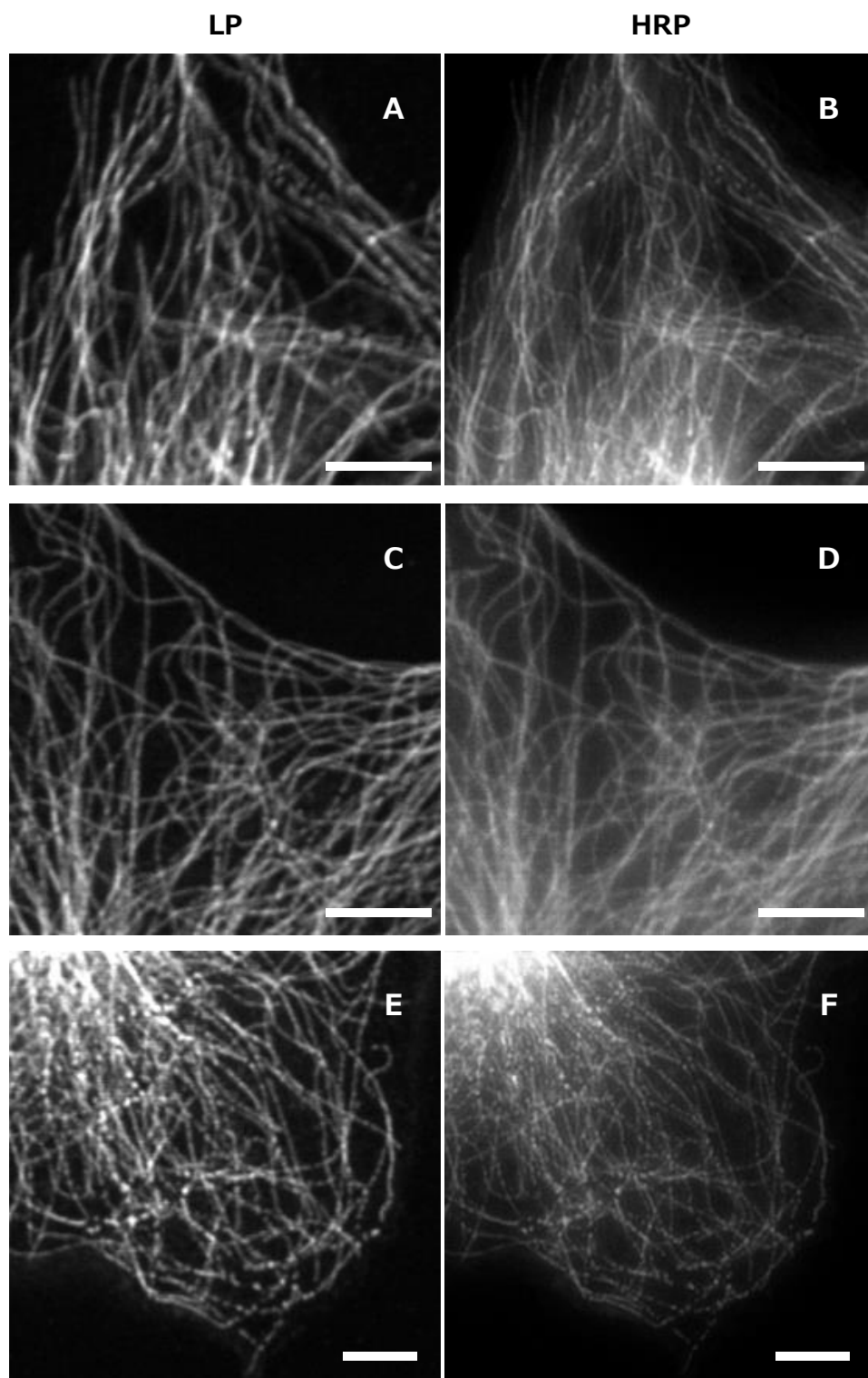


図 3 - 2 9 様々な蛍光色素で染色した COS-7 細胞の微小管の観察

これらの固定 COS-7 細胞の微小管は、Alexa Fluor 488 (A, B) Alexa Fluor 405 (C, D)、Alexa Fluor 546 (E, F)によって染色され、LP ビーム(A, C, E)と HRP ビーム (B, D, F)によって観察された。励起波長は、800 nm (A - D)と 910 nm (E, F)を使用した。スケールバーは1 μ m を示す。

3-3-4 生細胞の観察

次に HRP ビームを用いて、生細胞の観察を行った。本研究で作製した Lifeact-mTFP1 の発現プラスミドを COS-7 細胞に遺伝子導入し、培地中で 860 nm の励起により観察した。図 3-30 に示すように(B)の 0 min の画像におけるフィロポディアにひいた白線上の強度分布より半値全幅を測定したところ、LP ビームでは $0.294\ \mu\text{m}$ 、HRP ビームでは $0.229\ \mu\text{m}$ となった。このことより、HRP ビームによって分解能が向上したことを確認できた。また、LP ビームでは時間とともに、焦点面から外れていき、観察しづらくなっていた。これに対し、HRP ビームでは被写界深度が深いため、観察対象が z 方向に少し動いても観察し続けることが可能であった。このように HRP ビームは、生細胞観察においても、通常の顕微鏡よりも高い空間分解能と深い被写界深度で生細胞の観察を行うことが可能であることを示すことができた。

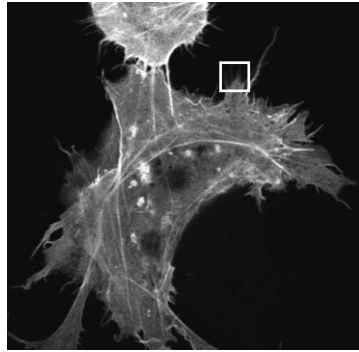
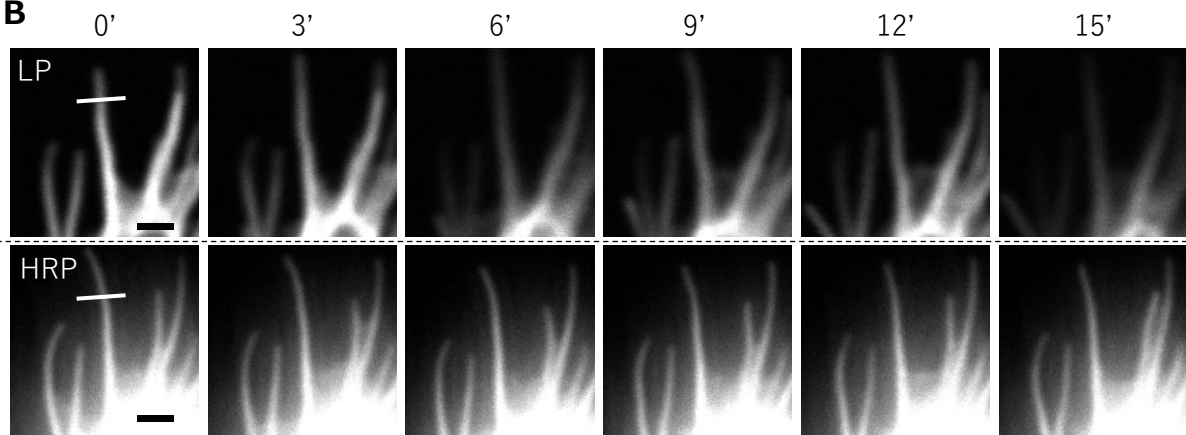
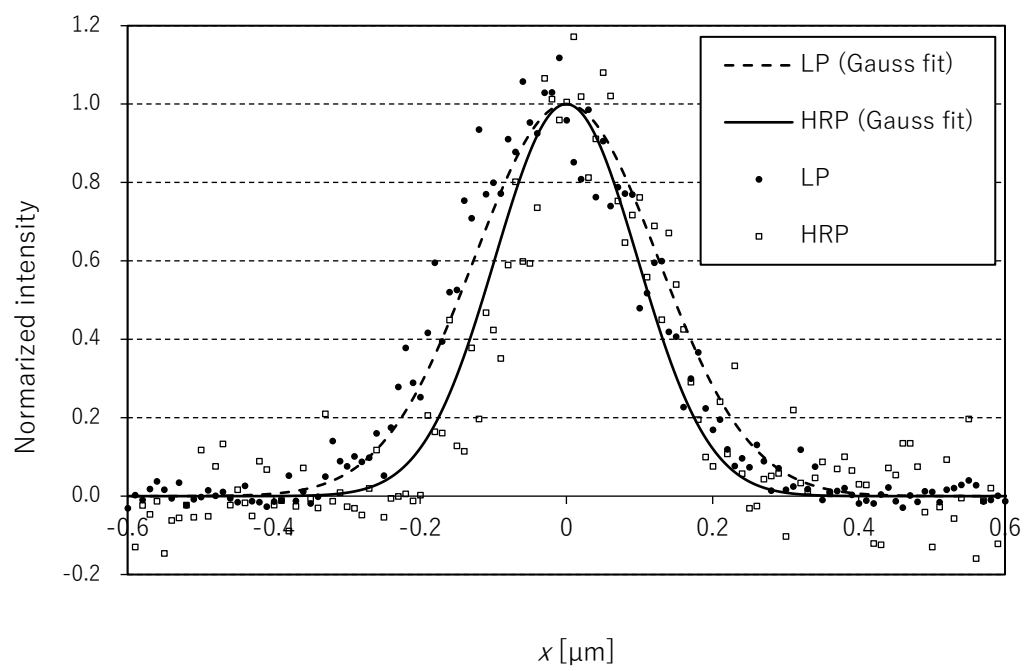
A**B****C**

図 3 - 3 0 COS-7 細胞のライブイメージング

(A-C) Lifeact-mTFP1 を発現させた COS-7 細胞のイメージング。(A) 細胞 1 個が入るように LP ビームで広めの視野で観察した結果。(B) A の四角い白枠を LP ビーム (上)、HRP ビーム (下) でそれぞれ観察した画像を示す。0 min の画像の右下に示した黒いスケールバーは、1 μm を示す。(C) B の白線上の強度プロファイルを示す。

3-4 考察

3-4-1 シミュレーション結果と実測結果の違い

2光子励起顕微鏡において蛍光ビーズを観察することにより得られた集光パターンは、シミュレーション結果と似たような集光パターンとなり、それぞれの半値全幅の値も、シミュレーション結果と比較してかなり近い値となった(図3-24、表3-2、表3-3)。このわずかな違いが生じた理由として以下のことが考えられる。シミュレーションではLPビームの強度分布は、ガウス分布として計算されているが、実験に使用したビームの強度分布が完全にガウス分布となっているわけではなく、少し強度分布が楕円になっているためである可能性がある。また、使用している対物レンズは、スカラービームで使用することを想定して設計されているため、対物レンズによる収差も原因の1つとなっている可能性がある。

3-4-2 HRP ビームのサイドローブについて

HRP ビームを高NAレンズで集光した場合には、小さな集光スポットが得られるが、それと共にサイドローブが現れることが、顕微鏡への応用時に問題となる。HRP ビームを共焦点顕微鏡に応用したときには、共焦点ピンホールによってサイドローブを除去することができた (Kozawa *et al.*, 2011)。一方で、2光子励起は励起光強度の2乗に比例して起こるため、励起光の光子密度が低いところでは2光子励起はほとんど起こらない。そのため、本研究にて HRP ビームを2光子顕微鏡に応用した結果では、サイドローブはほとんど目立たなかった。更に、対物レンズに入射するビーム径を小さくするとサイドローブが目立つようになり、ビーム径を大きくするとサイドローブがより目立たなくなることが判ったため、本研究ではビーム径を対物レンズの瞳径よりも大きい 8.47 mm にして観察を行った。また、最近、HRP ビームのビーム断面における最も外側のリング部分の光が集光スポットの中心の強度に大きく関与し、一方で内側の5つのリング部分の光は、サイドローブの強度に大きく関与することが明らかになった (Kozawa and Sato, 2012)。従って上述の実験結果は、対物レンズに入射するビーム径が小さくなることで、ビームの内側の5つのリング部分の強度が強くなり、サイドローブが強くなったためであると考えられる。

3-4-3 ガラス-水界面における HRP ビームの効果

ガラス-水界面上の蛍光ビーズを観察した際、アガロースに包埋された蛍光ビーズを観察したときよりも、LP では xy 面における分解能が悪くなり、HRP ビームでは分解能が向上した。これについては、屈折率の異なる界面において光軸方向の電場成分のみが増強したためだと考えられる(Dehez *et al.*, 2009)。図 3-31 に示す水色の点線で囲まれた領域においてガウスの法則を適用すると、各方向の電束密度については、(3. 8) 式のような関係になる。

$$D_{g, x} = D_{w, x} \quad D_{g, y} = D_{w, y} \quad D_{g, z} = D_{w, z} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot (3. 8)$$

従って、電場と誘電率とで書き換えると (3. 9) 式のようにになる。

$$E_{g, x} = E_{w, x} \quad E_{g, y} = E_{w, y} \quad \varepsilon_{glass} E_{g, z} = \varepsilon_{water} E_{w, z} \quad \cdot \cdot \cdot (3. 9)$$

z 方向（光軸方向）について式変形すると、(3. 10) 式のようにになる。

$$E_{w, z} = \frac{\varepsilon_{glass}}{\varepsilon_{water}} E_{g, z} = \left(\frac{n_{glass}}{n_{water}} \right)^2 E_{g, z} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (3. 10)$$

ガラスの屈折率 $n_{glass}=1.53$ 、水の屈折率 $n_{water}=1.33$ で $(E_{w, z})^4$ を計算すると、

$$(E_{w, z})^4 \propto \left(\frac{n_{glass}}{n_{water}} \right)^8 = 3.07 \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (3. 11)$$

となる。2光子励起においては、電場の4乗に比例することから、ガラスー水界面においては、光軸方向の電場成分だけが3倍程度、増強することになると考えられる。従って、図3－8に示したグラフを参照すると、光軸方向の電場成分の相対的な増強により HRP ビームでは空間分解能がアガロースビーズで観察したときよりも向上する結果となったと考えられる。そして、LP ビームについても、同様の理由により空間分解能が悪くなったと考えられる。

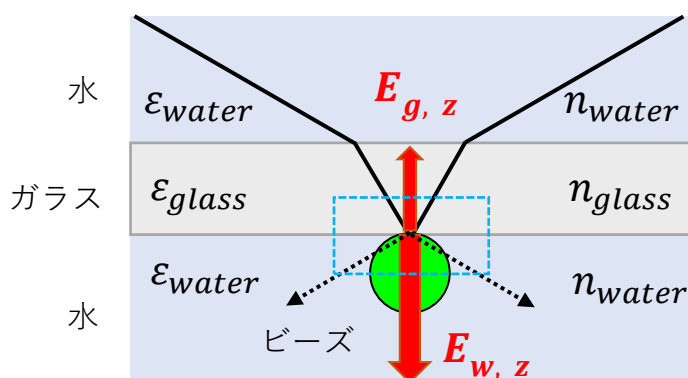


図3－31 水ーガラス界面における光軸方向の電場成分の増強

3-4-4 超解像顕微鏡と HRP ビームの比較

現在市販されている超解像顕微鏡は、本論文の結果よりも高い空間分解能を達成しているものがあるが、本論文で示した HRP ビームを使った技術にはいくつかの長所がある。超解像顕微鏡の一つであるローカリゼーション法では、色素に制限があり、蛍光の色や発光を切り替えることができるような蛍光プローブしか使用できない(Patterson *et al.*, 2010)。また STED 法は誘導放出を惹き起こすために、適切な蛍光分子を選択する必要がある(Patterson *et al.*, 2010)。それに対して、HRP ビームによる技術は、通常使用する 2 光子顕微鏡と同様の蛍光色素を使うことができる。また、HRP ビームは、通常のレーザー走査型顕微鏡の光学システムを変えることなく、液晶素子を対物レンズの前に装着するだけで利用できることもメリットである。これらの特長により、既に 2 光子顕微鏡を利用して観察を行っている場合には、実験系を変更することなくそのまま用いることができる。また、ローカリゼーション法のような技術は、時間分解能が悪いため、時間変化しない固定した細胞や組織の観察に限られる。HRP ビームは、本論文中でも示したように、ライブイメージングに応用可能である。短い露光時間で、十分な蛍光が得られるときには、レゾナントスキャナなどを使った高い時間分解能での観察に応用できる。ただしその場合は、明るい蛍光色素を利用

したり、高感度ディテクターや高出力レーザーを備えた顕微鏡システムを使用したりする必要があるかもしれない。

3-4-5 HRP ビームの被写界深度の深さについて

超解像顕微鏡は、 z 方向の分解能を向上できる場合がある。3次元イメージングをするときには、 z 方向の分解能が高いと、細かく xy 面のスライス画像を取得しなければならない。HRP ビームの集光パターンは z 方向に伸びた形となり、 z 方向の分解能が悪い。このため、 z 方向の微細な構造を観察することができない。しかし、被写界深度が深いというメリットとして捉えると、3次元イメージングをするとき、スライス画像の枚数が少なく済み、画像取得時間の短縮につながる。また、図3-30にあるように、光軸方向に動く観察対象をタイムラプスイメージで追いつけることもできる。この特長を活かしたイメージングとしては、 z 方向にも動く細胞内小胞の高速トラッキングや、スパインなどの微細な構造でのカルシウムイメージングなどが考えられる。

3-4-6 今後の展望

2光子顕微鏡の重要なアプリケーションに、生きた個体を用いた *in vivo* イメージングが挙げられる。理論的には HRP ビームを *in vivo* イメージングに応用することも可能である。しかし、組織の深部においては、生体の構造の屈折率差により生じる様々な収差の影響を受けることによって、HRP ビームが正しく集光しない可能性がある。生体組織内においても xy 面における高い分解能と深い被写界深度を達成するためには、補償光学による収差補正が必要になるだろう。

3-5 本研究のまとめ

2光子励起顕微鏡において HRP ビームを用いることで、分解能が向上すると共に、被写界深度が深くなった。また、様々な蛍光分子を用いて標識した固定細胞のサンプルを、高分解能で観察できた。この技術は、既存の顕微鏡に液晶素子を挿入するだけで利用可能であり、生細胞においても時間的分解能を損なうことなく使用できる。

参考文献

- Ai, H.-w., Henderson, J.N., Remington, S.J., and Campbell, R.E. (2006). Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem J* 400, 531-540.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* 313, 1642-1645.
- Dehez, H., Piché, M., and De Koninck, Y. (2009). Enhanced resolution in two-photon imaging using a TM₀₁ laser beam at a dielectric interface. *Opt. Lett.* 34, 3601-3603.
- Gustafsson, M.G.L. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy* 198, 82-87.
- Hell, S.W. (2007). Far-Field Optical Nanoscopy. *Science* 316, 1153-1158.
- Hell, S.W., and Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission: stimulated emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780-782.
- Huang, B., Babcock, H., and Zhuang, X. (2010). Breaking the Diffraction Barrier: Super-Resolution Imaging of Cells. *Cell* 143, 1047-1058.
- Klar, T.A., and Hell, S.W. (1999). Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 24, 954-956.
- Kozawa, Y., Hibi, T., Sato, A., Horanai, H., Kurihara, M., Hashimoto, N., Yokoyama, H., Nemoto, T., and Sato, S. (2011). Lateral resolution enhancement of laser scanning microscopy by a higher-order radially

polarized mode beam. *Opt. Express* *19*, 15947-15954.

Kozawa, Y., and Sato, S. (2007). Sharper focal spot formed by higher-order radially polarized laser beams. *J. Opt. Soc. Am. A* *24*, 1793-1798.

Patterson, G., Davidson, M., Manley, S., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). Superresolution Imaging using Single-Molecule Localization. *Annual Review of Physical Chemistry* *61*, 345-367.

Quabis, S., Dorn, R., Eberler, M., Glöckl, O., and Leuchs, G. (2000). Focusing light to a tighter spot. *Optics Communications* *179*, 1-7.

Richards, B., and Wolf, E. (1959). Electromagnetic diffraction in optical systems II. Structure of the image field in an aplanatic system, vol. 253: *Proceedings of the Royal Society A*, 358-379.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Soldner, R. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Meth* *5*, 605-607.

Rust, M.J., Bates, M., and Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Meth* *3*, 793-796.

Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H. (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology* *190*, 165-175.

Youngworth, K., and Brown, T. (2000). Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams. *Opt Express* *7*, 77-87.

第 4 章 本論文の結論と今後の展望

本論文では、第 2 章において、表皮の構造や厚さの恒常性を維持する機構を明らかにするために、マウスの様々な部位の皮膚について生体イメージングを可能にする 2 光子励起顕微鏡法を樹立することを目指した。そこで、細胞の挙動を可視化するため、ヒストン 2B タンパク質 H2B と緑色蛍光タンパク質 eGFP の融合タンパク質を発現する遺伝子改変マウス(R26H2BEGFP マウス)を利用し、皮膚の研究によく使われる体毛と色素がない系統の HR1/Hos マウスと交配することにより、R26H2BEGFP ヘアレスマウスの系統を樹立した。また、各部位に応じた皮膚の保定方法を確立することで、長時間にわたり安定的にマウス皮膚深部を観察することを可能とした。このように新たにマウス皮膚内部の細胞核のライブイメージング法を確立した。更に、真皮コラーゲン線維からの第二次高調波発生(SHG)光により、表皮と真皮の境界面は描出でき、基底膜上の細胞を基底細胞と特定できた。そして、背中、耳、足の裏、尻尾の皮膚を対象に経時的に観察した結果、基底細胞の細胞分裂を高精細に可視化することに成功した。そこで、細胞分裂の方向について 3 次元的に定量的に解析した結果、薄い表皮である背中や耳では 9 割以上の細胞分裂が基底膜に対し平行に分裂していたが、そ

れよりも厚い表皮を持つ足の裏や尻尾の interscale 領域では、7 割程度が平行に分裂し、3 割程度が斜め方向に分裂していた。更に、尻尾の scale 領域では、5 割以上も斜め方向に分裂していた。そして、表皮の厚さと斜め分裂頻度の関係を調べると、強く相関するという結果が得られた。これらの結果から、各々の部位における表皮では分裂方向の角度分布に違いがあり、分裂方向の分布の違いが表皮の厚さの違いを生んでいる可能性が示唆された。すなわち、厚い表皮では表皮のターンオーバーが速いと考えられていることから、斜め分裂は上の層への細胞の供給を早める役割を担っている可能性が示唆された。このように、本研究で確立した 2 光子励起顕微鏡法を用いることによって、生きたマウス個体の皮膚の経時変化を調べる事が可能となった。従って、本技術は、薬剤の皮膚への効果や副作用の影響を調べることに利用することが期待される。更に、化学的、物理的な刺激などに対する皮膚の生体防御反応を評価する方法としても利用できることが期待される。

一方、2 光子励起顕微鏡法は、通常の共焦点顕微鏡法と比較すると、励起波長が長いために空間分解能が低い。そこで本論文の第 3 章において、HRP ビームを用いて 2 光子励起顕微鏡の空間分解能の向上を試みた。励起波長に対して、液晶素子への印加電圧値、対物レンズ位置におけるビーム径についての条件検討を実施した。更に集光パターンを確認しながら補正環を使った厳密な補正を行

うことにより、数値計算の結果と同様に、軸方向の長さがビームウエストの10倍程度の細長い集光パターンを得た。HRP ビームを励起光源として利用することにより、 xy 面の空間分解能に関して、LP ビームと比較して2割程度の向上が確認できた。そして、免疫染色を行なった固定 COS-7 細胞の微小管についても高分解能に可視化することに成功した。また、生細胞の COS-7 細胞のアクチン動態については、高い空間分解能で、かつ焦点ずれをおこすことなく観察することに成功した。このように、HRP ビームは被写界深度が深いために、光軸方向に動く観察対象を高分解能で捉え続けることが可能である。従って、生細胞中の輸送小胞の高速なイメージングなどにも有効であろう。一方で、HRP ビームは光軸方向の電場成分が強いという特徴をもつことから、HRP ビームと LP ビームでの蛍光のシグナル比より3次元的な分子の配向方向に関する情報を取得することが期待される。この3次元分子配向イメージングにより、例えば、形質膜に挿入された蛍光分子を用いることにより、形質膜の微小構造や細胞膜電位などの変化を可視化できることが期待されている(Nuriya *et al.*, 2016)。このように、HRP ビームは生細胞の微細構造や機能を可視化するための有用な技術となると考えられる。その一方で HRP ビームを利用するためには、液晶素子の位置や、ビームの軸、補正環などの微調整が必要となる。そのため、様々なユーザーが HRP ビームを容易に利用可能にするには、それらの調整を自動的に実行する

システムを構築する必要がある。

今後は、この 2 光子 HRP 顕微鏡法を皮膚等に応用し生体イメージングが可能となることが期待される。特に、3 次元分子配向イメージングは、皮膚の経時的な観察に応用し、形質膜の微細な構造の変化などについて可視化できる可能性がある。また、SHG を利用して真皮のコラーゲン線維の分子配向の報告もあるので、HRP ビームを利用した 3 次元分子配向イメージングを用いて、真皮における解析にも適用できるだろう。

一方で、生体内において不可避である収差の影響により、HRP ビームが正しく集光しないと考えられる。従って、HRP ビームを用いた生体イメージングの実現のためには、補償光学による収差補正が必要になると考えられる。当研究室においても、透過型液晶素子を用いることにより、球面収差や非点収差補正、コマ収差等の補正を行うことが可能になってきた(Tanabe *et al.*, 2015, 2016)。今後は、これらの収差補正デバイス等の収差補正技術を用いることにより、更なる展開が期待できる。

本博士論文で示したように、新規 2 光子励起顕微鏡法を用いることで、時間的、空間的な多元的情報の取得が可能となり、生命科学に関する新しい知見が得られることが期待されるうえ、皮膚医学における診断や検査法にも応用することが期待される。

参考文献

Nuriya, M., Fukushima, S., Momotake, A., Shinotsuka, T., Yasui, M., and Arai, T. (2016). Multimodal two-photon imaging using a second harmonic generation-specific dye. *Nat Commun* 7, 11557.

Tanabe, A., Hibi, T., Ipponjima, S., Matsumoto, K., Yokoyama, M., Kurihara, M., Hashimoto, N., and Nemoto, T. (2015). Correcting spherical aberrations in a biospecimen using a transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy. *J Biomed Opt* 20, 101204.

Tanabe, A., Hibi, T., Ipponjima, S., Matsumoto, K., Yokoyama, M., Kurihara, M., Hashimoto, N., and Nemoto, T. (2016). Transmissive liquid-crystal device for correcting primary coma aberration and astigmatism in biospecimen in two-photon excitation laser scanning microscopy. *J Biomed Opt* 21, 121503.

謝辞

本研究は、2011 年 4 月より 2017 年 3 月にかけて、北海道大学 大学院情報科学研究科 生命人間情報科学専攻 脳機能研究室において行われました。

本研究を進めるにあたり、また、本論文を執筆するにあたり数多くの指導を賜りました、北海道大学大学院情報科学研究科の根本知己教授に深く感謝申し上げます。

実際に実験を行うにあたり、多岐にわたる助言を賜りました日比輝正特任講師には深く感謝申し上げます。また、本研究の内容に関して様々なご指摘、ご指導を承りました川上良介助教、大友康平助教、飯島光一朗特任助教に深く感謝申し上げます。

技術補佐の菊池東さん、洞内響さん、伊藤絵美子さん、小黑真紀さん、秘書の高藤志帆さん、本久洋子さんには、生活面から発表に関する助言まで多岐にわたりお世話になりましたことを厚くお礼申し上げます。

脳機能研究室の小泉絢香さん、武田和樹さん、青柳佑佳さん、澤田和明さん、田辺綾乃さん、伊藤理沙さん、長内尚之さん、渡邊裕貴さん、大嶋太矩人さん、北村瞭次さん、山口和志さん、松本朋大さん、鴨崎尚大さん、向山裕規さん、山中祐実さん、安宅光倫さん、後藤亜衣さん、高橋泰伽さんには研究を進めるにあ

たり、多くの助言を頂いたことを深く感謝致します。

また、第2章の研究を進めるにあたり、日本メナード化粧品株式会社の長谷川靖司さん、伊達靖さん、自然科学研究機構基礎生物学研究所の加藤輝特任助教、北海道大学電子科学研究所の秋山正和助教には、様々な助言を頂いたこと、心より感謝申し上げます。自然科学研究機構基礎生物学研究所の藤森俊彦教授には R26H2BEGFP マウスを提供して頂き深く感謝いたします。

第3章における研究の元となる理論を確立した東北大学の佐藤俊一教授、小澤祐市准教授には、その数値計算方法について細部にわたるご指導を頂いたことを深く感謝致します。シチズン時計株式会社の橋本信幸さん、栗原誠さんには実験に使用した液晶素子を作製して頂き深く感謝申し上げます。

研究業績

1. 主著学術論文（学位論文関係）

- (1) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Hibiki Horanai, Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto: 「Improvement of lateral resolution and extension of depth of field in two-photon microscopy by a higher-order radially polarized beam」, Microscopy 63(1), 23-32, doi: 10.1093/jmicro/dft041 (2014) (IF=1.285)
- (2) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto: 「Three-Dimensional Analysis of Cell Division Orientation in Epidermal Basal Layer Using Intravital Two-Photon Microscopy」, PLoS One 11(9), e0163199-1 - e0163199-18, doi: 10.1371/journal.pone.0163199 (2016) (IF=3.057)

2. 論文（その他）

- (1) Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto: 「Correcting spherical aberrations in a biospecimen using a

transmissive liquid crystal device in two-photon excitation laser scanning microscopy」, J. Biomed. Opt. 20(10), 101204-1 - 101204-11, doi: 10.1117/1.JBO.20.10.101204 (2015)

- (2) Ayano Tanabe, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima, Kenji Matsumoto, Masafumi Yokoyama, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Tomomi Nemoto: 「Transmissive liquid-crystal device for correcting primary coma aberration and astigmatism in biospecimen in two-photon excitation laser scanning microscopy」, J. Biomed. Opt. 21(12), 121503-1 - 121503-10, doi: 10.1117/1.JBO.21.12.121503 (2016)

- (3) Tomomi Nemoto, Terumasa Hibi, Sari Ipponjima: 「Liquid crystal devices heighten resolution in biological cell microscopy」, SPIE Newsroom, 10 December 2012, doi: 10.1117/2.1201211.004549 (2012)

2. 講演（学位論文関係）

- (1) 一本嶋佐理, 日比輝正, 小澤祐市, 洞内響, 佐藤綾耶, 栗原誠, 橋本信幸, 横山弘之, 佐藤俊一, 根本知己: 「高次径偏光ビームによる超解像イメージング」, 第 20 回日本バイオイメーjing学術集会, 北海道千歳市, 9.1 - 9.2 (2011)

(2) 一本嶋佐理, 日比輝正, 小澤祐市, 洞内響, 佐藤綾耶, 栗原誠, 橋本信幸, 横山弘之, 佐藤俊一, 根本知己:「ベクトルビームによるレーザー走査型顕微鏡の超解像化」, 光拠点第 4 回合同シンポジウム, 愛知県名古屋市, 11.14 (2011)

(3) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Hibiki Horanai, Aya Sato, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto: 「Improvement of spatial resolution in laser scanning microscopy with higher-order radially polarized beam generated by liquid crystal device」, The 12th RIES-Hokudai international Symposium, Sapporo, 11.21 - 11.22 (2011)

(4) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Hibiki Horanai, Aya Sato, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto: 「IMPROVEMENT OF THE SPATIAL RESOLUTION IN TWO-PHOTON MICROSCOPY WITH A VECTOR BEAM GENERATED BY LIQUID CRYSTAL DEVICES」, Focus on Microscopy 2012, Singapore, 4.1 - 4.4 (2012)

(5) 一本嶋佐理, 日比輝正, 小澤祐市, 洞内響, 佐藤綾耶, 栗原誠, 橋本信幸, 横山弘之, 佐藤俊一, 根本知己:「2光子顕微鏡におけるHRPビーム

を使った高分解能イメージング」, 第 27 回生体機能関連科学部会「若手フォーラム」, 北海道札幌市, 9.5 (2012)

(6) 一本嶋佐理, 日比輝正, 根本知己: 「In vivo 2光子イメージングによる表皮基底細胞における3次元的な分裂方向の解析」, 第 67 回日本細胞生物学会大会, 東京都文京区, 6.30 - 7.2 (2015)

(7) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto: 「Visualization of epidermal cell division in living mice using two-photon microscopy」, The 16th RIES-Hokudai international symposium 2015, Sapporo, 11.11 - 11.12 (2015)

(8) 一本嶋佐理, 日比輝正, 根本知己: 「皮膚の生体イメージングを用いた基底細胞の分裂方向の解析」, 「北大・部局シンポジウム」大学内研究ネットワーク促進プログラム『生体防御システムとその破綻』, 北海道札幌市, 3.7 (2016)

(9) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto: 「3D time-lapse analysis of basal cell division in living mouse skin using two-photon microscopy」, 第一回レゾナンスバイオ班会議, 静岡県熱海市, 3.16 - 3.17 (2016)

(10) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto: 「3D analysis of

basal cell division in living mouse using two-photon microscopy」 ,
HOKUDAI-NCTU Joint Symposium on Nano, Photo and Bio Sciences
in 2016, Sapporo, 10.4 - 10.5 (2016)

3.書籍

- (1) Kohei Otomo, Terumasa Hibi, Yuishi Kozawa, Sari Ipponjima,
Shunichi Sato, Tomomi Nemoto. Super-resolution two-photon
excitation microscopy utilizing transmissive liquid crystal devices, in
Alberto Diapro and Marc A. M. J. van Zandvoort (eds.), Super-
resolution imaging in medicine and biology, Taylor & Francic Books, inc.,
Chapter 10, 189-214 (2016)
- (2) 根本知己, 大友康平, 日比輝正, 一本嶋佐理 : 「透過型液晶デバイス
を用いたレーザー走査型顕微鏡の高解像化・超解像化」、(岡田康志編)
「実験医学別冊「初めてでもできる! 超解像イメージング」 羊土社,
235-241 (2016)

4.Web掲載

- (1) Asian Scientist (<http://www.asianscientist.com/2016/11/in-the->

lab/3d-imaging-skin-thickness-body/)

(2) ResearchSEA(http://www.researchsea.com/html/article.php/aid/10117/cid/3/research/medicine/hokkaido_university/why_is_skin_thick_on_the_soles_of_the_feet__.html)

(3) Phys.org (<http://phys.org/news/2016-10-skin-thick-soles-feet.html>)

(4) e! Science News (<http://esciencenews.com/sources/physorg/2016/10/18/why.skin.thick.soles.feet>)

(5) Alpha Galileo (<http://www.alphagalileo.org/ViewItem.aspx?ItemId=169077&CultureCode=en>)