

PRESS RELEASE

令和3年3月4日

国立大学法人高知大学
国立大学法人愛媛大学
国立大学法人山口大学

世界初 マウス脳深部領域の低侵襲的“血流”観察に成功

～脳機能・脳疾患の理解に向けた新たな二光子励起蛍光イメージング技術～

高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門の仁子 陽輔 助教らの研究グループは、愛媛大学大学院医学系研究科の今村 健志 教授、川上 良介 准教授及び山口大学大学院創成科学研究科の川俣 純 教授、鈴木 康孝 准教授らと共同して二光子蛍光顕微鏡用の新規高輝度蛍光材料を開発しました。この材料を用いることで、世界中の研究グループが挑戦してきたマウス脳深部領域の“血流”の観察に世界で初めて成功しました。

本成果は、令和3年3月3日付 John Wiley & Sons 社が発行するハイインパクトな材料科学系ジャーナル「*Advanced Functional Materials* 誌」オンライン版に掲載され、同誌の inside front cover に採択されました。

高齢化社会が進む我が国において、認知症や脳卒中など、脳を対象とした様々な難治性疾患・血管疾患の病理機構の解明とその治療法を開発することは極めて重要な取り組みです。それらを実現するためには、疾患モデル動物の脳神経や脳血管を“低侵襲的（＝動物を傷つけず）”かつ“高い時空間分解能（＝小さく細かい血管や神経をミリ秒単位）”で可視化する技術が必要不可欠です。これに該当する最先端光学技術として、現在、二光子励起蛍光イメージング（2PM）^{注1}が広く利用されています。2PMは、観察対象に蛍光物質を投与した後、同物質が発した蛍光を捉えて造影する“蛍光イメージング”の一つであり、特

に生体内部を観察するのに適した技術です。しかし、従前の 2PM はその観察可能深度が低く、例えばマウスの脳深部、特に記憶や学習能力に関わる“海馬”領域の血管の観察が極めて難しいという問題がありました。

高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門の仁子 陽輔 助教らの研究グループは、愛媛大学大学院医学系研究科の今村 健志 教授、川上 良介 准教授、および山口大学大学院創成科学研究科の川俣 純 教授、鈴木 康孝 准教授らと共同し、超高輝度（=高二光子励起発光効率^{注2}）な蛍光ナノエマルジョン^{注3}を開発しました。この蛍光ナノエマルジョンを用いて 2PM を実施したところ、世界で初めて、マウス脳深部領域（白質層、海馬 CA1）の“血流”を観察することに成功しました。

これまで世界中の数多くの研究グループが、蛍光物質を高輝度化することで、2PM で観察できる深さを拡張しようと挑戦してきました。それらの中にはマウス海馬領域血管の撮影に成功した例も僅かにありますが、一画像の取得に1秒以上要してしまうため、高速で生じる血管径・血流速度などの変化を捉えることが困難でした。一方、本蛍光ナノエマルジョンは既報の蛍光ナノ粒子群と比べて 10~1000 倍に相当する輝度をもち、0.01 秒程度での一画像取得が可能となりました。その結果、“血管”の画像化のみならず、血液が流れる（=血流）様子を映画並みのフレームレート（120 fps）^{注4}で観察することができました。

本技術を活用することで、脳の高次機能を司る大脳皮質から海馬領域に至るまでの脳血管・血流と神経回路機能の観察が可能となるため、脳高次機能のメカニズム解明や、脳血管が関与する様々な疾患の診断、予防および治療法の開発に繋げることができると期待されます。

【ポイント（図1参照）】

- ピレンと呼ばれる多環式芳香族化合物を母核とした新たな蛍光物質 “LipoPYF5” を開発した。LipoPYF5 は、二光子励起蛍光イメージング（2PM）で汎用されるローダミン類などよりも高い輝度（=二光子励起発光性）を示す。
- “ナノエマルジョン” と呼ばれる粒子に多量の LipoPYF5 を包摂させることで、超高輝度な蛍光ナノエマルジョンを開発した。この蛍光ナノエマルジョンを用いることにより、マウスの血中に多量の LipoPYF5 を投与し、循環させることが可能となった。
- 蛍光ナノエマルジョンを投与したマウスの脳血管を 2PM によって観察したところ、脳表面から約 1.5 mm の血管を観察することに成功した。
- ハイフレームレート（120 fps）による撮像を行ったところ、白質層（~0.9 mm）や海馬 CA1 領域（~1.1 mm）の血管が観察され、さらに動画化することでその血流を直接

観察することに成功した。2PM によるマウス脳深部の血流観察に成功したのは本研究が世界初である。

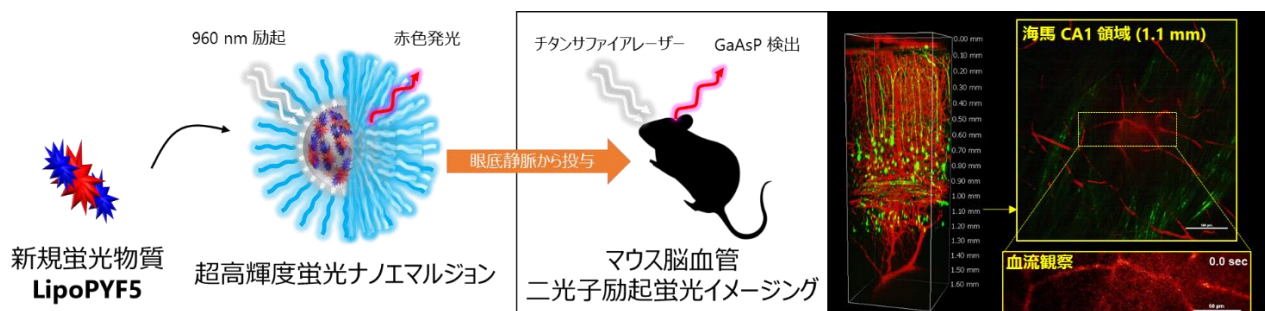


図 1. 本研究概略図

【研究背景と内容】

脳血管はその近傍にある脳神経の活性に応答してそのサイズ（血管径）や血流速度を変化させることで知られています。例えば、脳内の活発に機能している領域においては、当該領域に十分な栄養や酸素を供給するため脳血管は拡張し、血流量を増加させます。こうした機能は neurovascular coupling と呼ばれており、この機能の低下が様々な神経疾患・血管障害と関連していると考えられています。脳血管動態を理解し、上述した疾患に対する診断法・治療法を開発していくためには、生きている疾患モデル動物の脳血管を低侵襲的（＝動物を傷つけず）かつ高い時空間分解能（＝小さく細かい血管や神経をミリ秒単位）で可視化する技術が必要となってきます。

二光子励起蛍光イメージング（2PM）は低侵襲性と空間分解能に優れた最先端光学技術であり、近年、生体イメージングに広く利用されています。2PM は蛍光イメージング技術の一つであり、その原理は以下の通りです。

- ① 観察対象に蛍光物質を導入し、そこに励起レーザー光を照射して蛍光物質を発光させる
- ② 蛍光物質が発した蛍光を検出器で捉え、画像化する

近年、様々な蛍光物質が開発され、また励起レーザーや検出器が飛躍的に進歩した結果、マウスの脳海馬領域（脳表面から > 1 mm）の血管を撮影することが可能になりました。しかし、従来の技術では脳海馬領域血管の1画像の取得に数秒要してしまい（＝低時間分解能）、高速で生じる脳血管の動態変化を捉えることが困難でした。同様に、1画像の取得時間を短くした場合、撮影に十分な蛍光量が得られなくなるためマウスの脳の皮質領域（< 0.75 mm）までしか観察できない、という問題がありました。仁子助教らはこの問題に取り組むため、蛍光物質科学・光学的観点を統合した以下のような仮説を立てました。

仮説：励起レーザーや蛍光検出器との相性がよく、しかも高輝度（＝高い二光子励起発光効率）な蛍光物質を多量にマウス血中へと投与することで、画像取得時間の高速化・観察可能深度の向上が可能である

1. 高輝度色素 LipoPYF5 の合成（図2参照）

仁子助教らは、ピレンと呼ばれる多環式芳香族を母核とした蛍光物質 PY に着目しました。仁子助教および川俣教授らによる先行研究により、PY は 2PM にて汎用される蛍光物質であるローダミン類、シアニン類よりも高い二光子励起発光効率を有していることが明らかとなっています（Y. Niko, *et al. J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 184）。また、PY は 960 nm という波長の励起レーザー照射で発光することがわかっています。この波長は生体透過性が高く、かつ励起レーザー（チタンサファイアレーザー）の出力が大きいいため、脳深部観察に有利となります。さらに、PY は 650 nm 程度の赤色の蛍光を発します。この波長は、高感度な GaAsP 検出器の検出感度の高い波長域とマッチしています。

以上の観点から、PY は光学系との相性や高輝度性に優れた、有力な蛍光物質であると言えます。しかし、PY をそのままマウスに投与すると、迅速に腎排出されてしまうことや、血管壁への吸着、血中での析出など、様々な問題が生じてしまいます。この問題を解決するには、PY をナノエマルジョンに包摂させることが有効であり（後述）、そのためには、水溶性である PY を、ナノエマルジョンと馴染む脂溶性物質へと変換する必要があります。そこで本研究では、PY の脂溶性誘導体 LipoPYF5 を合成しました。

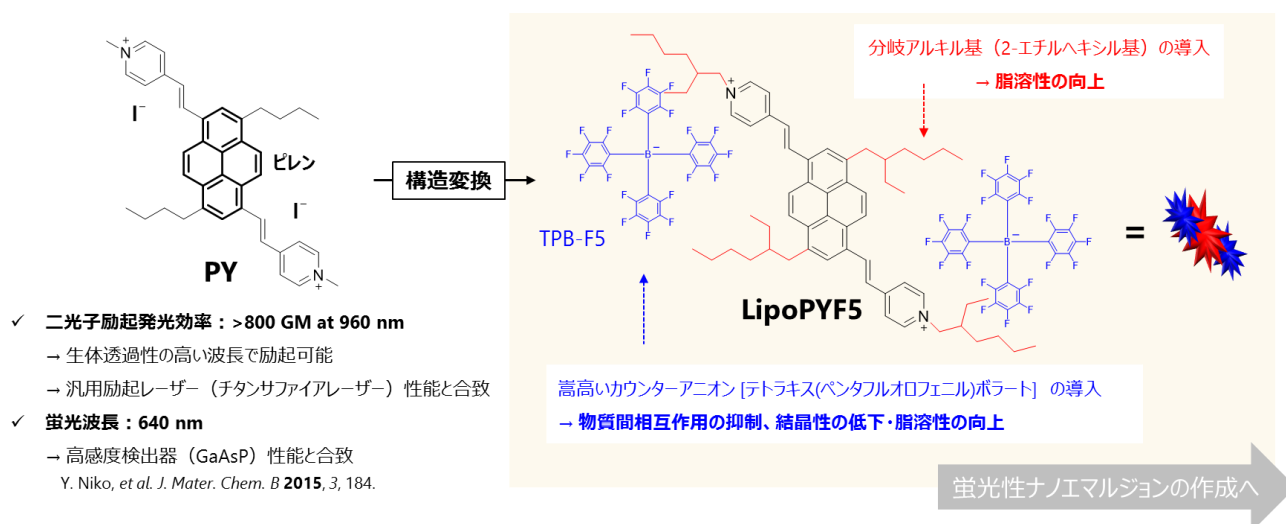


図2. PY とその脂溶性誘導体 LipoPYF5 の設計について。

2. LipoPYF5 を高密度集積した超高輝度蛍光ナノエマルジョンの開発（図3参照）

PY のような低分子蛍光物質を多量にマウスの血中に投与しようとするとう様々な問題が起こります。先述した血管壁への吸着、血中での析出の他、過剰投与による毒性の問題が

挙げられます。また、低分子蛍光物質はすぐに腎排出されるため血中に残りにくいという問題があります。これらの問題を解決するために、仁子助教らは、ナノエマルジョンと呼ばれる材料に注目しました。ナノエマルジョンは内核が油、外殻が界面活性剤からなるナノサイズの粒子であり、脂溶性物質の包摂能に優れる他、生体適合性が高いといった特徴があります。したがって、LipoPYF5 を多量に包摂したナノエマルジョン (= 蛍光ナノ粒子) を作成することで、マウスの血中に多量の LipoPYF5 を安全に投与できると期待されます。また、直径が数 10 nm の粒子は腎排出されにくく、血中滞留時間が長くなるといった点もメリットとして挙げられます。LipoPYF5 は、PY をナノエマルジョンに包摂させることを目的に設計されたものでした。

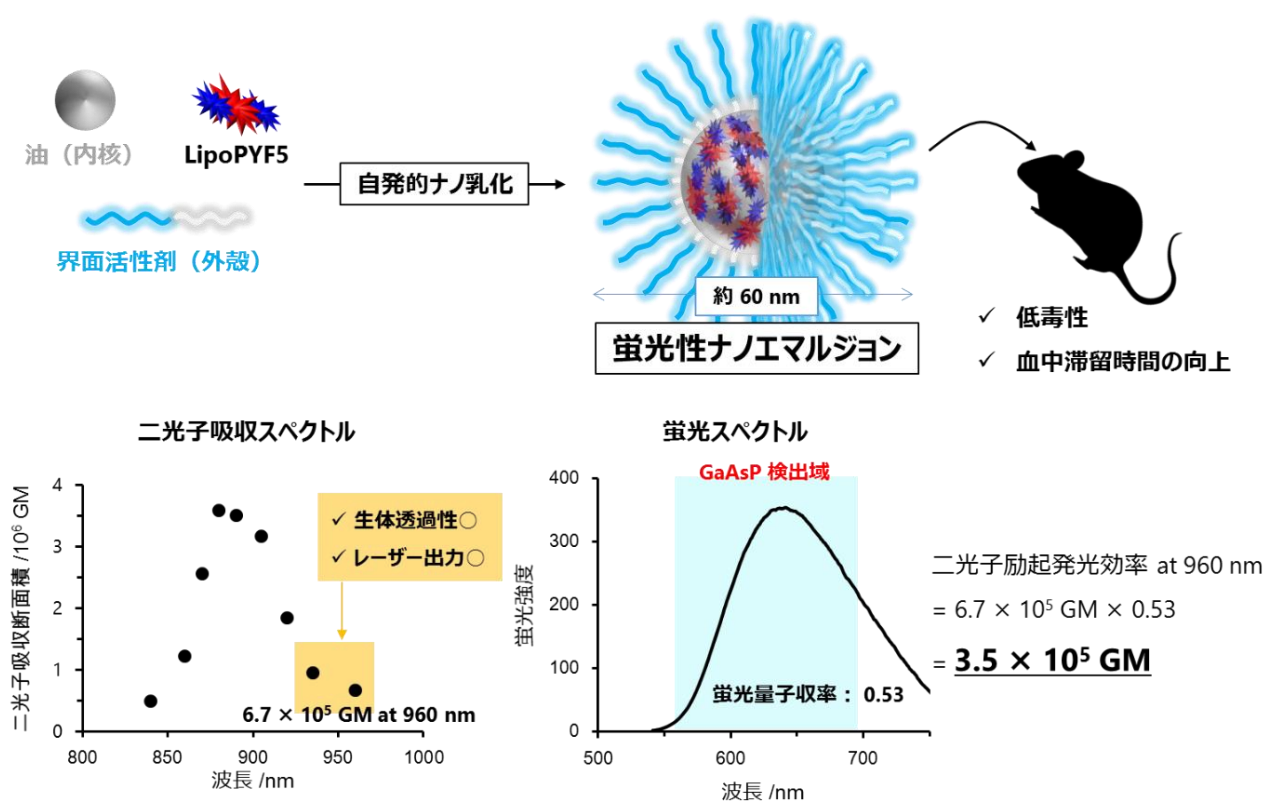


図 3. LipoPYF5 含有超高輝度蛍光ナノエマルジョンの作成とその光機能について。

本研究では、直径が 60 nm の蛍光ナノエマルジョンを作成しました。粒子内部には 2000 個以上の LipoPYF5 分子が含まれています。通常、蛍光物質はこのような高密度状態では物質間相互作用によって蛍光性を消失してしまいます。しかし、LipoPYF5 は嵩高いカウンターアニオン (TPB-F5) を有しているため、そうした物質間相互作用を最小化することができます。すなわち、LipoPYF5 を用いることで、PY の強力な赤色発光性、そして 960 nm における二光子吸収性を維持しつつ、それらをナノエマルジョン内部へと高密

度集積させることに成功しています。このナノエマルジョンは、これまでに開発されてきた脳血管造影用の蛍光ナノ粒子と比べ 10~1000 倍もの輝度を誇ります。

3. 超高輝度蛍光ナノエマルジョンを用いたマウス脳血管イメージング (図4参照)

上記2にて開発した、LipoPYF5 含有の蛍光ナノエマルジョンをマウス (神経細胞に蛍光タンパク質を発現させたトランスジェニックマウス) の眼底静脈から投与し、2PM を行ったところ、脳表面から 1.5 mm に相当する領域の血管を観察することができました。神経細胞の位置から、この深度はマウスの脳の白質層を超え、海馬領域にまで達していることがわかりました。これは、市販の血管造影剤 テトラメチルローダミン-デキストラン (TMR-dextran) を用いた場合の観察深度 (0.7~0.9 mm 程度) を大きく上回ります。

これまで僅かではありますが、2PM によって海馬領域血管の観察に成功した例がありません。そうした研究の中では、海馬領域を観察するためには、強い光散乱体である白質層を通過できる特殊な長波長 (> 1000 nm) 励起レーザーの使用が必要だと考えられていました。しかし、本研究で開発された蛍光ナノエマルジョンを用いることで、市販の、すなわち世界中の研究者が使用している汎用的なチタンサファイア励起レーザーでも十分に海馬領域血管の観察が可能となりました。

続いて、1 画像の取得時間が 0.01 秒未満になるよう設定したハイフレームレート (120 fps) での 2PM を行ったところ、脳表面から 0.9 mm (白質層)、最深部では 1.1 mm (海馬 CA1) の血管を撮影できました。染色されていない血球が黒い球形の影として流動している様子を捉えることができ、結果として白質層や海馬 CA1 領域血管の “血流” を観察することに繋がりました。このように、2PM によってマウス脳深部領域の血流を直接観察したのは本研究が世界初となります。

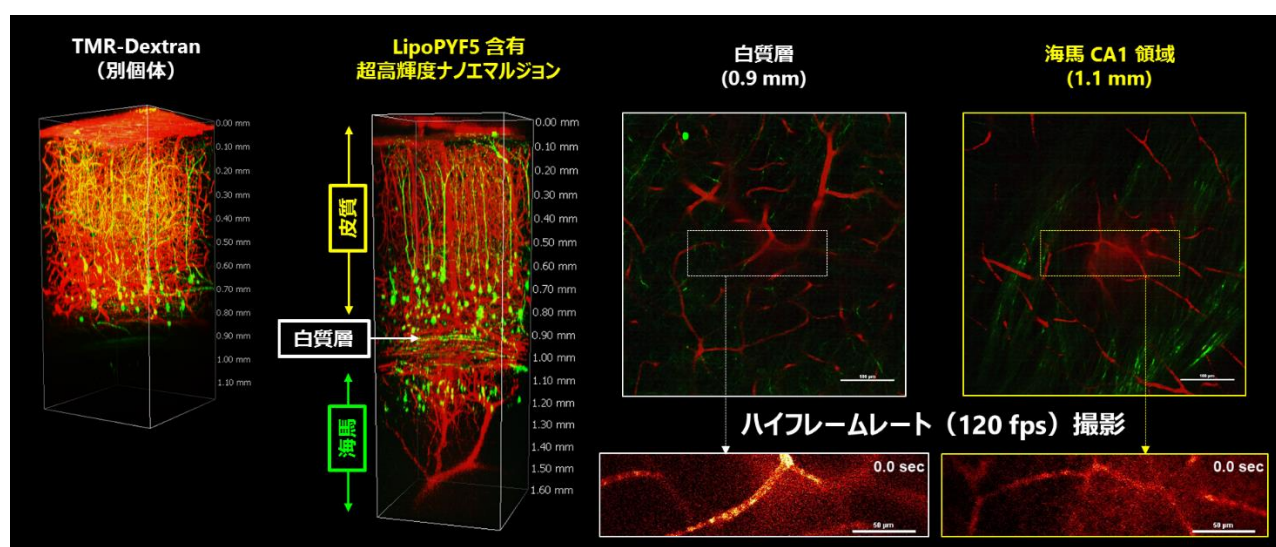


図4. TMR-Dextran および超高輝度ナノエマルジョンを用いたマウス脳深部血管イメージングについて。TMR-Dextran を使用した実験では別個体のマウスを用いており、最大深度を出す 880 nm の励起波長を使用している。赤色は蛍光ナノエマルジョンによって染色された脳血管、緑～黄色は蛍光タンパク質によって染色された脳神経を表している。

【成果の意義】

本研究では、世界で初めて、2PM によるマウスの脳深部領域の血流観察に成功しました。本研究にて開発された蛍光ナノエマルジョンは、市販されている二光子励起蛍光顕微鏡のスペックでも十分に力を発揮できるよう機能設計されているため、世界中の研究者も利用することができます。今後この蛍光ナノエマルジョンを用いることで、脳の高次機能を司る皮質から海馬領域における脳血管・血流と神経回路機能の観察が可能となり、認知機能のメカニズム解明に利用できると期待されます。他にも、薬剤投与に対する脳血管挙動を観察することで、脳血管疾患の発症機構解明とそれに基づく予防、診断および治療法の開発に繋げることができると期待されます。

最後に、本稿では割愛しましたが、本研究では単に役に立つ蛍光物質を開発しただけではなく“今後はどのような蛍光物質を設計・開発していけばいいか”という化学者の疑問に応え得る、数多くの示唆を残しています。そのため、本研究成果を基に、今後さらなる脳深部の血管動態観察を可能とする新規蛍光物質の創出が期待されます。

【用語説明】

注1) 二光子励起蛍光イメージング (2PM) とは、蛍光物質の「二光子吸収性」を利用した蛍光イメージング技術の一つであり、生体深部観察、および3D観察に優れている点に特徴がある。図5に示すように、通常、蛍光物質は一つの光子を吸収して電子励起状態に達し、蛍光を放射する(=一光子吸収)。しかし、強力なレーザー光を照射した場合、蛍光物質は二つの光子を同時に吸収して電子励起状態に達し、蛍光を放射することができる(=二光子吸収)。二光子吸収では、蛍光物質は一光子吸収と比べて約半分のエネルギー、すなわち約2倍の波長の光を吸収する。この二光子吸収現象を利用することで、生体透過性の高い長波長の光で蛍光物質の蛍光放射を誘起することができるため、生体深部の観察に有利となる。また、二光子吸収現象は光子密度の高いレーザー光の焦点付近でのみ生じるため、レーザー光焦点を x-y-z 方向に走査することで、3D画像を取得することができる。

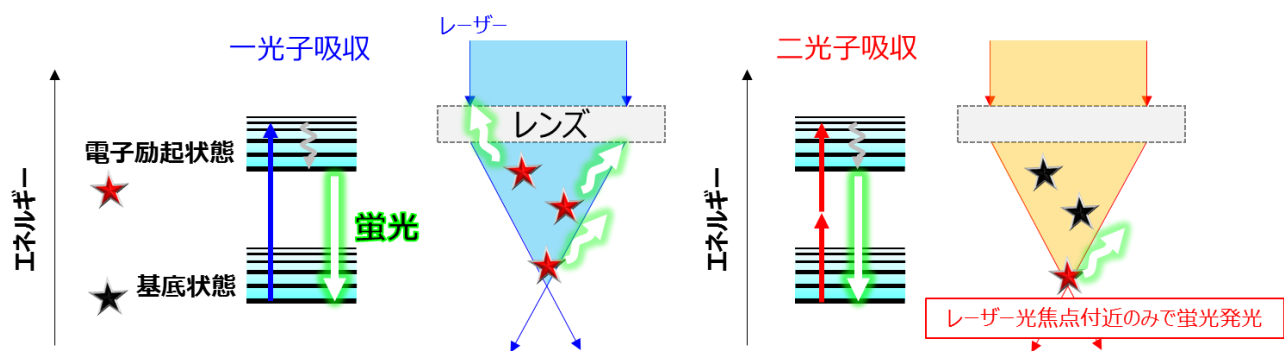


図5. 一光子吸収と二光子吸収について。

注2) 二光子励起発光効率とは、2PMにおける蛍光物質の輝度を表す指標であり、蛍光物質の「二光子吸収断面積(=二光子吸収効率, 単位 GM ($\text{GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$))」と「蛍光量子収率(=電子励起状態にある蛍光物質のうち、蛍光放射して基底状態へと戻るものの割合)」の積で算出される。この値が大きいほど、2PMにおいて“明るい蛍光物質”であることを意味している。

注3) エマルジョンとは、内核(油)・外殻(界面活性剤)が液-液界面からなるソフトな粒子であり、特に本研究のような水中で作成されたものはO/W型(oil in water)と呼ばれている。ミニエマルジョン、マイクロエマルジョンなど様々な形態のものが知られているが、ナノエマルジョンは10~100 nm程度の直径(1 nm = 10億分の1m)で希釈や温度変化に強いという特徴を有することから生体応用が期待されている。

注4) フレームレートとは、1秒間の動画が何枚の画像で構成されているかを表すものであり、fps(frames per second)という単位で表記される。この値が大きいほど滑らかな動画となり、短時間の間に生じた現象を捉えることができる。

【論文情報】

雑誌名 : *Advanced Functional Materials*

論文タイトル : Integrated Fluorescent Nanoprobe Design for High-Speed *In Vivo* Two-Photon Microscopic Imaging of Deep-Brain Vasculature in Mice

著者 : 竹崎 陽¹, 川上 良介², 大西 省三³, 鈴木 康孝³, 川俣 純³, 今村 健志², 波多野慎悟¹, 渡辺 茂¹, 仁子 陽輔^{1*}

所属 : 1. 高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門、2. 愛媛大学大学院医学系研究科、3. 山口大学大学院創成科学研究科 (*責任著者)

DOI :10.1002/adfm.202010698