

氏名	もりとも ひろき 守友 博紀
授与学位	博士(学術)
学位記番号	医博甲第1480号
学位授与年月日	平成29年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項
研究科, 専攻の名称	医学系研究科(博士後期課程) 応用分子生命科学系専攻
学位論文題目	フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源に用いた多光子励起蛍光イメージング (Multi-photon fluorescence microscopy imaging using a femto-second fiber laser as an excitation light source)
論文審査委員	主査 山口大学 教授 川 俣 純 山口大学 教授 山 崎 鈴 子 山口大学 教授 村 藤 俊 宏 山口大学 准教授 綱 島 亮 山口大学 准教授 鈴 木 康 孝

【学位論文内容の要旨】

BTPHSA の二光子吸収帯は、MLCT 帯のちょうど倍の波長域である800 - 1200 nmに観測された。その二光子吸収断面積（二光子吸収の効率を表す量）の極大値は1030 nmで18 GM (1 GM=10⁻⁵⁰ cm⁴ s molecule⁻¹ photon⁻¹)であった。さらに、このBTPHSAをプローブとして、低酸素環境下にあるhuman embryonic kidney 293 (HEK293)細胞のフェムト秒ファイバーレーザー励起二光子イメージを取得することができた。この結果より、波長500 - 600 nm付近にMLCTあるいはLMCTを示す発光性金属錯体を設計あるいは選択すれば、フェムト秒ファイバーレーザー励起二光子イメージングを行うことができることを明らかにした。

本論文では、三光子吸収を励起過程とし、フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源とした多光子蛍光イメージングを実現することにも取り組んだ。三光子吸収は、二光子吸収と比べてその発生確率が極めて低いため、高効率に三光子励起蛍光を示すプローブでなければフェムト秒ファイバーレーザー励起多光子イメージングには用いることができない。そこで、高効率三光子励起蛍光プローブの選択指針を導き出すため、1030 nmにおいて三光子吸収を示すことが見込めるカチオン性蛍光プローブ、すなわち1030 nmの1/3の波長、330 - 350 nm付近に吸収帯を有する蛍光性化合物1、2、および3を選択して、これらの一光子吸収挙動と三光子吸収挙動との関係を調査した。

波長340 nmにおけるモル吸光係数と水中での蛍光量子収率の積の値、すなわち波長340 nmでの一光子励起蛍光効率が低い化合物ほど、1030 nm励起で効率よく三光子励起蛍光を示すことが明らかになった。本研究で取り扱った化合物のなかで、最も高い三光子励起蛍光効率を示した化合物1により染色されたHEK293細胞の三光子励起蛍光イメージを示す。高効率に三光子励起蛍光を示す化合物を用いることで、明瞭な像を取得できることが明らかになった。以上の調査によって、波長1030 nmで効率よく三光子吸収が生じる従来型の蛍光プローブを探索すれば、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起多光子イメージングの色素バリエーションを増やすことができることを明らかに出来た。

本論文で提唱したフェムト秒ファイバーレーザー励起多光子蛍光イメージングにおけるプローブ選択指針は、プローブの種類の少なさ故普及が進まなかったフェムト秒ファイバーレーザー励起多光子イメージングを世に広めることに貢献するものである。本論文の成果により、これまでレーザー装置の取り扱いに長けた技術者のみが行えた二光子蛍光イメージングを誰もが簡単に使える技術へとすることができた。

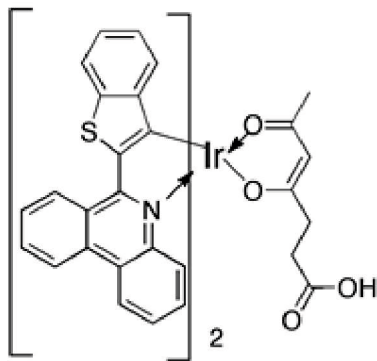


図1 BTPHSA の構造式

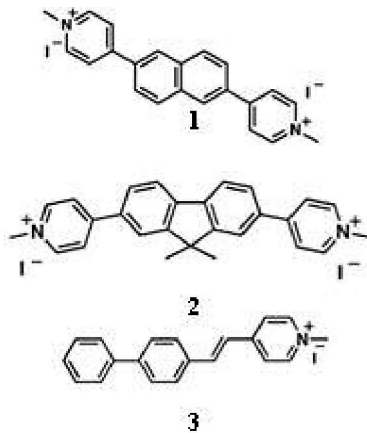


図2 化合物 1、2、および 3 の構造式

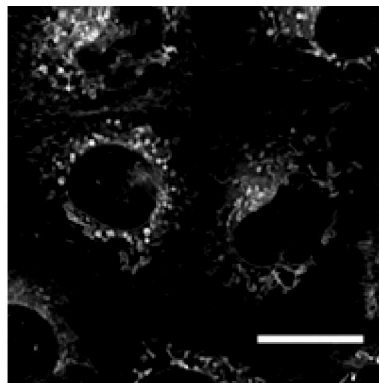


図3 化合物 1 により染色された HEK293 細胞の三光子励起蛍光イメージ (スケールバー; 25 μm)

【論文審査結果の要旨】

【論文審査の結果及び最終試験の結果】

多光子励起蛍光顕微鏡は、生体組織を三次元的にマイクロメートルオーダーで可視化するツールである。現在、多光子励起蛍光顕微鏡の励起光源には、波長可変フェムト秒パルスチタンサファイアレーザーが一般に用いられている。しかしこのレーザー装置は、発振波長が 690 - 1040 nm の範囲で可変ではあるものの、温度が一定で低湿度な環境でしか動作しないこと、装置が高価で大きいことという欠点がある。一方、フェムト秒ファイバーレーザーは、出力がチタンサファイアレーザーと比べて低く発振波長も 1030 nm もしくは 1050 nm に固定されてはいるものの、温度や湿度といった外部の環境が変化しても安定して動作するという利点がある。このフェムト秒ファイバーレーザーを多光子励起蛍光顕微鏡の光源とすることができれば、この顕微鏡を動物が飼育されている部屋や手術室など、診断や治療の現場で利用できるようになる。多光子励起過程の中で、最も励起効率が高いのは二光子吸収過程である。しかしながら、合成化学的な難しさから、1030 nm 付近の光源により二光子励起が可能、つまり一光子吸収帯が 515 nm にあり、生体に投与するのに必要な水溶性を示し、かつ生体内で高い蛍光量子収率を示すプローブは、学位申請者が以前開発した一例に限られていた。このことが、フェムト秒ファイバーレーザー励起による多光子イメージングを実現する上での高いハードルとなっていた。そこで、本論文では、フェムト秒ファイバーレーザー励起による多光子イメージングに用いる蛍光色素のバリエーションを増やすことを目的に、金属錯体を二光子励起すること、励起過程として三光子吸収を利用すること、の2つの戦略を考案し、その有効性を実証している。

遷移金属錯体の中には、配位子と金属との間の metal to ligand charge transfer (MLCT) や ligand to metal charge transfer (LMCT) により 515 nm に一光子吸収帯をもつものがある。そのような遷移金属錯体に、生体に投与するのに必要な水溶性や、生体内で高い蛍光量子収率を示す性質が付与できれば、フェムト秒ファイバーレーザーによる二光子励起に適したプローブが得られると申請者は着想した。このアイデアの有効性を2章で議論している。モデルとして、波長 500 - 600 nm 付近に MLCT に帰属される一光子吸収を示す発光性 Ir 錯体を用い、二光子吸収特性の評価、さらにこの Ir 錯体をプローブとして用いたフェムト秒ファイバーレーザー励起の多光子イメージングを行っている。この錯体の二光子吸収帯は、MLCT 帯のちょうど倍の波長、1000 - 1200 nm 付近に現れ、フェムト秒ファイバーレーザーでの二光子励起に適していた。実際、フェムト秒ファイバーレーザー励起による二光子イメージングにも成功している。この結

果より、波長 500 - 600 nm 付近に MLCT を示す発光性金属錯体を設計あるいは選択すれば、フェムト秒ファイバーレーザー励起二光子イメージングを行うことができることを明らかにしている。

第3章では、従来は効率が低いことから顧みられることがほとんどなかった三光子吸収過程を利用しても、三光子吸収効率に優れるプローブを適切に選択すれば、フェムト秒ファイバーレーザー励起による多光子励起蛍光イメージングが行えることを実証している。波長 1030 nm の光を用いて三光子励起する場合、1030 nm の 1/3 の波長、350 nm 付近に存在する吸収帯を励起することになる。350 nm 付近に吸収帯をもつ化合物は数多くあるので、それらの中から三光子吸収効率が高い化合物を効率よく選ぶ方法論の確立を行った。モデルとして 350 nm における一光子の吸収係数が異なる 3 種類の蛍光性分子を用いて、1030 nm でのファイバーレーザー励起の三光子吸収効率と、一光子の吸収係数との関係を調査した。その結果、波長 350 nm 付近に大きなモル吸光係数を示し、かつ生体中での蛍光量子収率が高い化合物を選べば、フェムト秒ファイバーレーザー励起による三光子イメージングが可能であるとの結論が導かれた。

公聴会では、(1)イリジウム錯体が酸素に応じて消光されるメカニズムは何か、(2)二光子吸収に比べて、三光子吸収過程は単純なモデルで解釈できるのはなぜか、(3)多光子顕微鏡の本質とも言える生体内への光の深達性の観点から、本論文で取り上げた化合物の有効性はどうなっているのか、などに関する質問があった。いずれの質問に関しても、発表者から適切な回答がなされた。

以上よりこの研究は、独創性・新規性・有効性・実用性ともに優れ、博士(学術)の論文に十分値すると判断した。

論文内容、および、審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、関連論文の発表状況は下記の通りである。(関連論文 計1編、参考論文 計6編)

1. Hiroki Moritomo, Akinari Fujii, Yasutaka Suzuki, Toshitada Yoshihara, Seiji Tobita, Jun. Kawamata, Biological oxygen sensing via two-photon absorption by an Ir(III) complex using a femtosecond fiber laser, Japanese Journal of Applied Physics, 2016, Vol. 55, No. 9. 092401.