

博士論文

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

平成 29 年 3 月

守友 博紀

山口大学大学院医学系研究科

1 章 序論	1
1. 1. 二光子吸収現象	1
1. 2. 二光子励起蛍光顕微鏡.....	3
1. 3. Yb-dope ファイバーレーザー励起の問題点.....	5
1. 4. これまでの研究成果	7
1. 4. 1. Ti: sapphire レーザー励起を指向した研究.....	7
1. 4. 2. フェムト秒ファイバーレーザー励起を指向した研究.....	9
1. 5. 本論文の目的と構成	12
1. 6. 参考文献	15
2 章 イリジウム錯体の二光子吸収特性とフェムト秒ファイバーレーザーを用いた 酸素センシング.....	18
2. 1. 導入	18
2. 2. 実験	19
2. 2. 1. 試料.....	19
2. 2. 2. 光学測定.....	19
2. 2. 3. 細胞の培養と染色.....	20
2. 2. 4. 一光子励起蛍光顕微鏡観察	21
2. 2. 5. 多光子励起蛍光顕微鏡観察	21
2. 3. 結果と考察.....	23
2. 3. 1. 一光子吸収・二光子吸収特性.....	23
2. 3. 2. 発光特性.....	24
2. 3. 3. 一光子励起蛍光顕微鏡観察	26
2. 3. 4. 二光子励起蛍光顕微鏡観察	27

2. 4. 結論	28
2. 5. 参考文献.....	29
3章 Yb-dope ファイバーレーザーによる三光子励起蛍光イメージングのための蛍 光プローブ選択指針.....	31
3. 1. 導入	31
3. 2. 実験	33
3. 2. 1. 試料.....	33
3. 2. 2. 光学測定.....	36
3. 2. 3. 多光子励起蛍光顕微鏡観察	36
3. 2. 4. Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源としたときの励 起過程の決定.....	37
3. 3. 結果と考察	38
3. 3. 1. 一光子吸収、蛍光スペクトル	38
3. 3. 2. 多光子励起蛍光顕微鏡観察	39
3. 3. 3. 1030 nm における励起過程の調査	40
3. 3. 4. 三光子励起蛍光効率の見積もり	41
3. 4. 結論	42
3. 5. 参考文献.....	43
4章 総括	44

1 章 序論

1. 1. 二光子吸収現象

二光子吸収とは、物質が2つの光子を同時に吸収して励起状態に遷移する現象である。二光子吸収の光吸収量は、入射光強度の2乗に比例する。それゆえ、入射光をレンズで集光すると、光強度の高い焦点付近でのみ二光子吸収が生じ、焦点以外では光吸収が生じない状態をつくりだすことが可能である^{1,2}。つまり、二光子吸収現象を用いると、焦点の位置を変化させることで、媒体中の三次元空間内の特定の場所でのみ光吸収を生じさせることが可能となる。

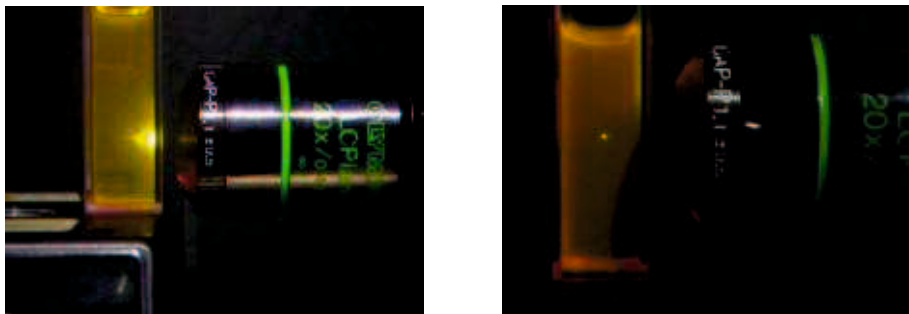


図 1-1 一光子吸収(a)と二光子吸収(b)により蛍光色素溶液を光励起した際に生じる蛍光の様子
(藤井旺成氏の修士論文より引用)

図 1-1 にレーザー光を、対物レンズで集光して蛍光色素の入ったセルに入射した様子の写真を示す。図 1-1(a)は、532 nm の光を励起光に用いた一光子励起蛍光、図 1-1(b)には 1030 nm の光を励起光に用いた二光子励起蛍光の様子である。写真(a)では、セルの右端付近、すなわち入射側でのみ蛍光が観測されている。これは、一光子吸収が生じる条件下では、励起光はセルに入射されると直ちに蛍光色素に吸収されて減衰するためである。一方、二光子吸収の様子を示す写真(b)では、焦点付近でのみ蛍光

が観察されており、それ以外の場所、つまり焦点付近以外では光吸収が生じず、蛍光が観察されていない。このように、二光子吸収では、焦点の場所を変化させることにより、任意の場所で光吸収を生じさせることが可能である。

1. 2. 二光子励起蛍光顕微鏡

蛍光顕微鏡を用いて生体組織を観察する際、像を取得するためには、観察対象に蛍光プローブを導入し、そのプローブを光励起して生じる蛍光を観察することで、対象を可視化する。二光子励起蛍光顕微鏡は、蛍光プローブの光励起に二光子吸収を利用する^{3,4}。二光子励起蛍光顕微鏡は、ガルバノスキャナを用いて、レンズの焦点を二次元面内でスキャンをし、その焦点面からのみ生じる蛍光を検出することで画像を得る。したがって、通常の（一光子励起の）蛍光顕微鏡とは異なり、i) 焦点面のみの情報が取得できるため、焦点面を上下させることで生体組織の三次元的なイメージングが可能、ii) 一光子励起と比べて長波長の光を励起光に用いるため、励起光の散乱が少なく、組織のより奥深くまで励起光を到達させることができる、といった特徴をもつ。これらの特徴から、二光子励起蛍光顕微鏡は、生体組織や臓器の観察に有力なツールとされており、脳神経科学、がん、免疫、骨などの研究に盛んに利用されるようになっている⁵⁻¹⁰。

現在、二光子励起蛍光顕微鏡の励起光源には、波長可変 Ti: sapphire レーザーが一般的に用いられている。図 1-2 には、Coherent 社により開発された Ti: sapphire レーザー、Mira の写真を示している。このレーザーは、発信波長を 690 – 1040 nm の範囲でチューニングすることができるものの、i) 安定して発振する温度・湿度範囲が極めて狭く、専用のレーザー実験室でないと使えない、ii) サイズが縦 20 cm、横 30 cm、奥行き 1 m と比較的大きいこと、iii) 価格が高額であること、という問題がある。それゆえ、二光子励起蛍光顕微鏡は、この Ti: sapphire レーザーが安定して動作する温度や湿度が徹底的に管理された部屋でのみしか使うことができない。このことが二光子励起蛍光顕微鏡の汎用性を大きく下げている。

Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーは、Ti: sapphire レーザーとは異なり、光伝

搬媒質として光ファイバーが用いられている。図 1-2 に浜松ホトニクス社により開発された Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーの写真を示している。Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーは、発信波長が 1030 もしくは 1050 nm 付近に固定されているものの、i) 外部の環境が変化しても安定して発振を続ける、ii) サイズが縦 10 cm、横 30 cm、奥行き 30 cm と、Mira と比べおおよそ 1/2 でありコンパクトであること、iii) 価格が Ti: sapphire レーザーのおおよそ 1/10 であること、といった Ti: sapphire レーザーには無い利点がある。したがって、二光子励起蛍光顕微鏡の励起光源を Ti: sapphire レーザーから Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーへと取り替えることができれば、例えば動物実験室や手術室のような、手術室や動物室などこれまで二光子励起蛍光顕微鏡を設置出来なかった場所で、二光子励起蛍光イメージングを行うことができるようになり、その汎用性が大きく高まることが期待される。

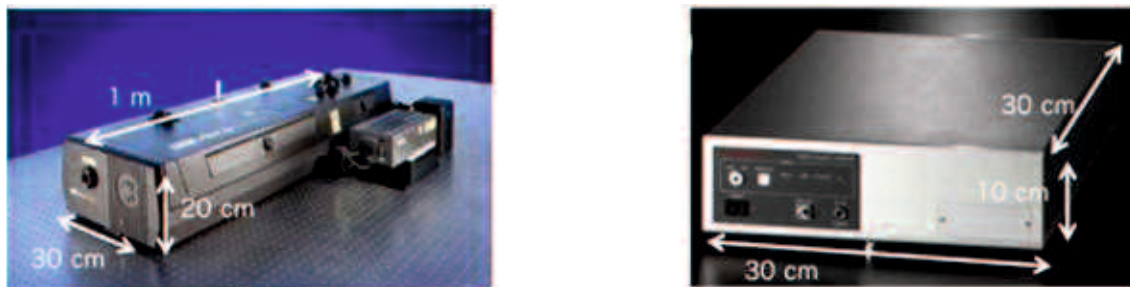


図 1-2 Ti: sapphire レーザー（左、Spectra Physicist 社 Web ページより引用、スケールを加筆）と Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー（右、浜松ホトニクス社のパンフレットより引用、スケールを加筆）の写真

1. 3. Yb-dope ファイバーレーザー励起の問題点

前述したように、二光子励起蛍光顕微鏡の励起光源として Yb-dope ファイバーレーザーを用いることには大きな期待が持たれている。しかし、その実現にあたっては、解決すべき問題点がある。

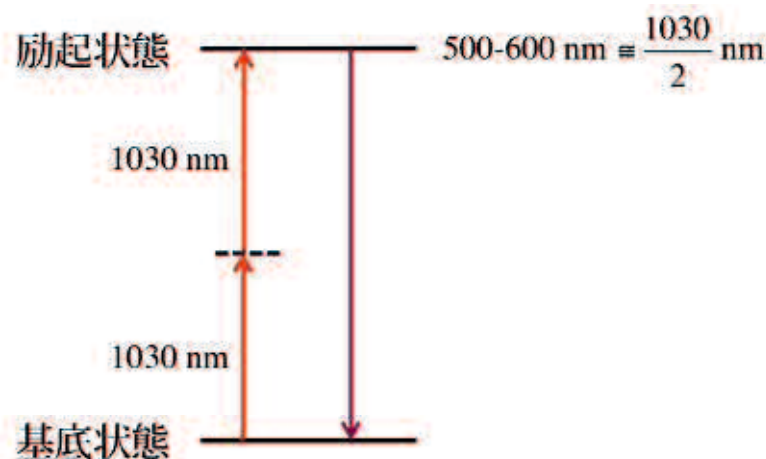


図 1-3 化合物を 1030 nm において二光子励起する際のエネルギーダイアグラム

図 1-3 には、蛍光色素を 1030 nm 付近で蛍光色素を二光子励起する場合のエネルギーダイアグラムを示している。二光子吸収帯が 1030 nm 付近にある化合物は、500 - 600 nm 付近に一光子吸収帯を持つことになる。シアニン系色素を中心に、一光子吸収帯を 500 - 600 nm 付近に持つ蛍光色素は数多く存在するが、それらのうち生体組織を可視化するためのプローブに求められる条件 i) 生体にドープするだけの十分な水溶性を示す、ii) 生体組織中、すなわち水溶媒系で高輝度に蛍光を示す、iii) 生体中の特定のイベントを可視化できる、という条件を全て同時に解決した色素は、1. 4. 2 に示す筆者が開発したピレン誘導体に限られる。つまり、1030 nm において蛍光色素を二光子励起する場合、蛍光色素の選択肢には限りがある。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広めていくためには、観察に用いることのできる蛍光色素の種類を増加させる必要がある。

1. 4. これまでの研究成果

筆者はこれまでに、多光子励起蛍光顕微鏡観察の高感度化を目指し、高効率多光子励起蛍光プローブを開発してきた。この節では、これまでの研究成果を紹介する。

1. 4. 1. Ti: sapphire レーザー励起を指向した研究

● ミトコンドリアの膜電位モニター用ビフェニル誘導体

細胞の活力の指標の一つであるミトコンドリアの膜電位をモニターする機能をもつプローブとして、図 1 - 4 に構造を示すビフェニル誘導体 *N,N'*-dimethyl-4,4'-(biphenyl-2,1-ethenediyl)dipyridinium hexafluorophosphate (BP) を開発した¹²。図 1 - 5 に、BP により染色された human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞の、ミトコンドリア膜電位低下前後の二光子励起蛍光顕微鏡画像を示す。BP は生きた細胞中のミトコンドリアの膜電位が正常なときはミトコンドリアに局在し、その一方で膜電位が低下したときには染色場所を核へと移行させる、という二光子励起蛍光顕微鏡下で膜電位を観察するにあたり有効な性質を持つ。これまでに報告されているミトコンドリアの膜電位モニター用プローブは、ミトコンドリアの膜電位の低下に伴い蛍光色が変化したり、蛍光強度が低下したりするものが報告されている。蛍光色を変化させるプローブを用いた場合は、膜電位の低下前後で観察に用いる励起光波長を変化させなければならない。二光子励起蛍光顕微鏡で観察を行う際、励起光波長を変更する操作は、レーザー装置内の光路の再調整が要求されるため、観察時の手間となる。また、蛍光強度を低下させるタイプのプローブを用いた場合は、蛍光プローブそれ自身の消光と、ミトコンドリアの膜電位の低下による蛍光強度との低下を切り分ける必要がある。これらの従来型のプローブとは異なり BP は、単一の励起波長で、

かつ消光を考慮する必要なくミトコンドリアの膜電位のモニターを可能とさせるプローブであった。この BP の二光子吸収断面積（二光子吸収の効率を表す量）は、250 GM (1 GM= 10^{50} cm⁴ s molecule⁻¹ photon⁻¹)と、緑色蛍光タンパク質の 8 GM や、rhodamine 123 の 80 GM と比べても数倍大きく、二光子励起蛍光顕微鏡を用いた高感度なミトコンドリアの膜電位のモニターを全く新しいメカニズムにより可能とさせるプローブであった。

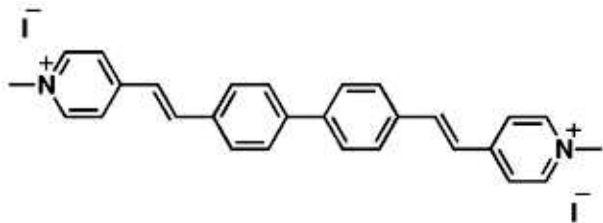


図 1-4 ビフェニル誘導体 BP の構造式

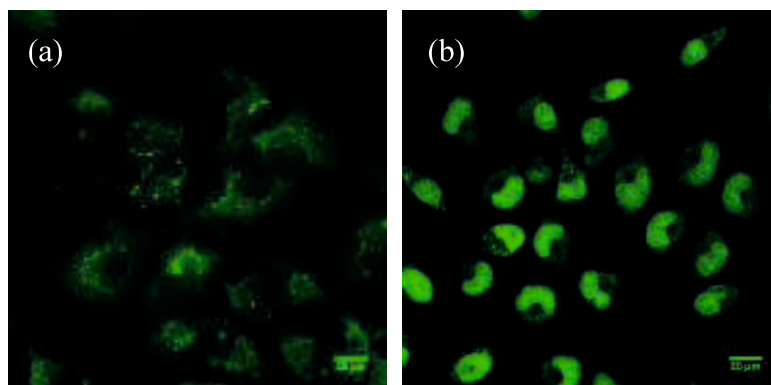


図 1-5 ミトコンドリアの膜電位が正常(a)、低下(b)したときの HEK293 細胞の二光子励起蛍光顕微鏡画像

- 高深度二光子励起蛍光イメージングのためのアントラセン誘導体

“生体の光学窓 (Tissue optical window)” と呼ばれ、生体組織による光散乱、光吸

収がそれ以外の波長域と比べて小さな波長域である 600 – 1000 nm¹³ に蛍光を示す化合物として、図 1 - 6 に構造を示すアントラセン誘導体 1,1'-dimethyl-4,4'-(2,6-anthrylenedi-2,1-ethenediyl)dipyridinium diiodide (AC)の開発にも従事した¹¹。AC の蛍光極大波長は 600 nm であり、二光子吸収断面積の極大値は波長 703 nm において 687 GM であった。AC は蛍光波長、励起波長がともに生体透過性のよい波長域に位置しているため、生体組織深部の観察に効力を発揮する。

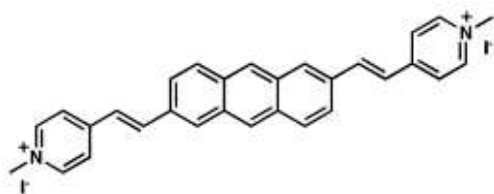


図 1 - 6 アントラセン誘導体 AC の構造式

1. 4. 2. フェムト秒ファイバーレーザー励起を指向した研究

前項の成果を足がかりとし、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起を目指した研究も行った。

● 高効率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のためのピレン誘導体

1030 nm において高効率に二光子励起ができるよう、アントラセン誘導体からさらに π 電子共役系を拡張した図 1 - 7 に構造を示すピレン誘導体 4,4'-((1E,10E)-(3,8-dibutylpyrene-1,6-diyl)bis(ethene-2,1-diyl))bis(1-methylpyridin-1-ium) iodide (PY)を設計した¹⁴。PY は、生体にドープするだけに十分な水溶性、Yb-dope ファイバーレーザーの発振波長である 1030 nm における世界トップクラスの二光子励起

発光効率、そしてミトコンドリアへ局在する機能も兼ね備えている。この PY は、1.3 で述べた Yb-dope 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を行う上での問題点を解決した唯一の例である。

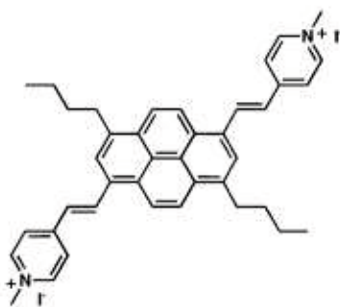


図 1-7 ピレン誘導体 PY の構造式

また、1030 nm で発振する Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーで複数の蛍光色素を同時励起することにより、対象を色分けして観察することを指向した研究も行った。具体的には、1030 nm で多光子励起が可能で、発光帯の幅が狭いためそれぞれの化合物の発光帯の重なりのないプローブを複数生み出すことを目指した。そこで、発光幅の狭い希土類金属錯体に着目し、図 1-8 に構造を示す Eu 錯体 tris(2-naphthyltrifluoroacetato)europium(III) (Eu(ntfa)) の多光子励起発光挙動を調査した¹⁵。その結果、Eu(ntfa)が 1030 nm で三光子励起が可能であることを見だし、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源として生細胞の三光子励起蛍光イメージを取得することも成功した。得られた画像を図 1-9 に示す。

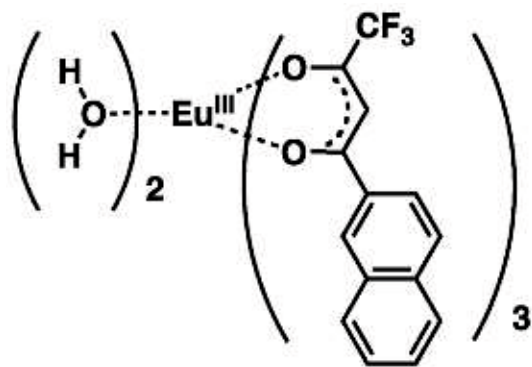


図 1-8 Eu(NTFA)₃の構造式

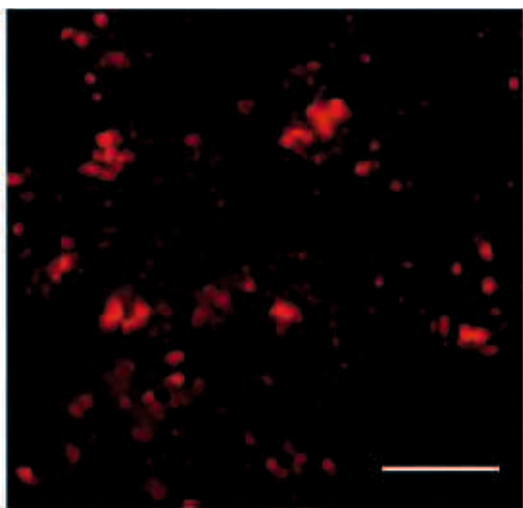


図 1-9 Eu(NTFA)₃により染色された HEK293 細胞のフェムト秒ファイバーレーザー励起三光子イメージ

1. 5. 本論文の目的と構成

本論文の目的及び構成は以下の通りである。

本章3節でも述べたように、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源とした二光子励起イメージングを行う際には、蛍光プローブの吸収帯は500–600 nmに設定する必要がある。しかし、その波長域に吸収を持つ蛍光物質の多くは細胞を染色し、観察するにあたって使い勝手の悪いものが多い。

一方、一光子吸収帯が300–400 nm付近に存在し、可視光領域に蛍光を示す化合物であれば、高効率に二光子励起蛍光効率を示すのみならず、例えばpHの変化といった生体中の現象を可視化する機能すらもつものが開発されている¹⁶。それらの多くは、Ti: sapphire レーザーを励起光源において二光子励起が可能であるが、1030 nmにおける二光子励起効率が極めて低い。以上のように、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーによる二光子励起イメージングの普及のためには、色素の選択肢が少ない、という現状を打破する必要がある。

そこで、まず第2章では、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起のイメージングに、金属錯体を利用することに関して述べる。波長500–600 nm付近に一光子吸収帯を示す有機化合物を得るためには、平面性の高い大きな π 電子共役系をもつ化合物を設計しなければならないが、そのような分子設計は π - π スタッキングによる水溶性の低下や蛍光の消光を招いてしまう。また、大きな π 電子共役系を持つ化合物は、水はおろか有機溶媒に対する溶解性も低いため、合成にも困難が伴う。一方、吸収波長が500 nmに届かない単純な π 電子系を持つ有機化合物であっても、それを遷移金属に配位させれば、 $\pi^* \leftarrow \pi$ よりも長波長側に metal to ligand charge transfer (MLCT)や、ligand to metal charge transfer (LMCT)を示す金属錯体を得ることができる¹⁷。さらに、金属錯体の場合、中心金属に対して構造の異なる配位子を配位させることもできるた

め、設計上の自由度も有機化合物と比べて高くなる。金属錯体の分光的性質の一例として、図 1 - 10 に tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) Perchlorate ($\text{Ru}(\text{dpphen})_3$) 錯体のクロロホルム溶液の一光子、二光子吸収スペクトルを示す¹⁸。波長 250 – 350 nm の $\pi^* \leftarrow \pi$ 遷移よりも長波長側の、波長 400 – 500 nm 付近に MLCT 帯が現れた。そして、この MLCT 帯の倍の波長域である 800 nm 付近に二光子吸収帯が観察された。1, 10-phenanthroline は、それ単独で見れば 250 – 350 nm 付近にしか吸収を示さないが、このように単純な π 電子共役系を持つ化合物を配位子に用いたとしても、金属と組み合わせて金属錯体とすることで長波長側に吸収帯をもつ材料を得ることができる。

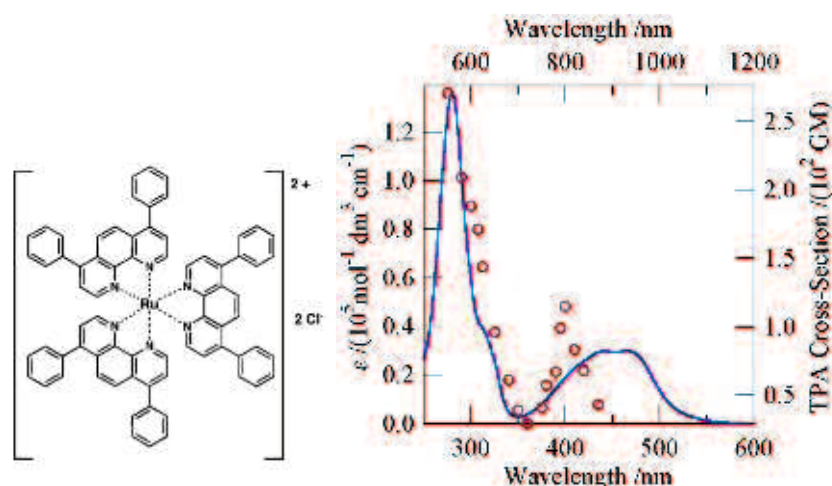


図 1 - 10 $\text{Ru}(\text{dpphen})_3$ の構造式 (左) と、そのクロロホルム溶液の一光子 (縦軸左、横軸下、実線青)、二光子吸収スペクトル (縦軸右、横軸上、マーカー赤) (右) (Ref. 18 より引用)

この知見に基づけば、波長 500 – 600 nm 付近に MLCT を示し、かつ生体中で発光を示す金属錯体も Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起イメージングに有効であると考えられる。そこで 2 章では、波長 500 – 600 nm 付近に MLCT を示す Ir 錯体の二光子吸収特性を調査した。その結果、MLCT 帯の倍の波長域 1000 – 1200 nm に二

光子吸収帯が観察され、1030 nm で十分二光子励起が可能であることがわかった。さらに、Ir 錯体をプローブとして、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起により二光子イメージを撮影することができた。この研究により、金属錯体も Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源とした二光子イメージングに有効であることを示すことができた。

第3章では、三光子吸収を励起過程に用いたイメージングについて述べる。三光子吸収効率は、二光子吸収効率と比べ桁違いに小さいために、蛍光イメージングにおいては実用的ではないとされてきた。しかし、蛍光イメージングに用いる対物レンズは、非常に光を強く集光でき、比較的弱いパワーのレーザー光を用いても集光点での光強度を高めることができるため、二光子吸収より発生確率の低い三光子吸収も十分に生じ得ると考えた。三光子吸収を用いれば、一光子吸収帯が 300–400 nm 付近にある化合物を励起できるため、これまで開発されている数多くのプローブを利用できるようになる。そこで3章では、高効率三光子励起発光を示すプローブを効率よく探索するための分子選択指針を確立した。そのために、筆者がこれまでに開発に携わってきた蛍光性化合物のうち、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ものを選択して、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。その結果、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起三光子イメージング像を取得することができた。このことから、たとえ 1030 nm において二光子吸収効率に優れなくとも、三光子吸収を利用すれば Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーでイメージングができることを明らかにすることができ、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源に用いた蛍光イメージング用プローブの多様化を達成した。

1. 6. 参考文献

- (1) He, G. S.; Tan, L.-S.; Zheng, Q.; Prasad, P. N. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1245–1330.
- (2) Dvornikov, A. S.; Walker, E. P.; Rentzepis, P. M. Two-Photon Three-Dimensional Optical Storage Memory. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13633–13644.
- (3) Denk, W.; Strickler, J.; Webb, W. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* **1990**, *248*, 73–76.
- (4) Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. Nonlinear Magic: Multiphoton Microscopy in the Biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369–1377.
- (5) Khoury, C. C.; Khayat, M. F.; Yeo, T.-K.; Pyagay, P. E.; Wang, A.; Asuncion, A. M.; Sharma, K.; Yu, W.; Chen, S. Visualizing the Mouse Podocyte with Multiphoton Microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *427*, 525–530.
- (6) Lecoq, J.; Parpaleix, A.; Roussakis, E.; Ducros, M.; Goulam Houssen, Y.; Vinogradov, S. A.; Charpak, S. Simultaneous Two-Photon Imaging of Oxygen and Blood Flow in Deep Cerebral Vessels. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 893–898.
- (7) Ruan, Q.; Chen, Y.; Gratton, E.; Glaser, M.; Mantulin, W. W. Cellular Characterization of Adenylate Kinase and Its Isoform: Two-Photon Excitation Fluorescence Imaging and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 3177–3187.
- (8) 発光の辞典-基礎からイメージングまで. In; 朝倉書店; pp. 630–636.

- (9) Ishii, M.; Egen, J. G.; Klauschen, F.; Meier-Schellersheim, M.; Saeki, Y.; Vacher, J.; Proia, R. L.; Germain, R. N. Sphingosine-1-Phosphate Mobilizes Osteoclast Precursors and Regulates Bone Homeostasis. *Nature* **2009**, *458*, 524–528.
- (10) Okada, T.; Miller, M. J.; Parker, I.; Krummel, M. F.; Neighbors, M.; Hartley, S. B.; O'Garra, A.; Cahalan, M. D.; Cyster, J. G. Antigen-Engaged B Cells Undergo Chemotaxis Toward the T Zone and Form Motile Conjugates with Helper T Cells. *PLoS Biol* **2005**, *3*, e150.
- (11) Tominaga, M.; Mochida, S.; Sugihara, H.; Satomi, K.; Moritomo, H.; Fuji, A.; Tomoyuki, A.; Suzuki, Y.; Kawamata, J. A Red Fluorescence Two-Photon Absorption Probe for Sensitive Imaging of Live Mitochondria. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 1490–1492.
- (12) Moritomo, H.; Yamada, K.; Kojima, Y.; Suzuki, Y.; Tani, S.; Kinoshita, H.; Sasaki, A.; Mikuni, S.; Kinjo, M.; Kawamata, J. A Biphenyl Type Two-Photon Fluorescence Probe for Monitoring the Mitochondrial Membrane Potential. *Cell Struct. Funct.* **2014**, *39*, 125–133.
- (13) Weissleder, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317.
- (14) Niko, Y.; Moritomo, H.; Sugihara, H.; Suzuki, Y.; Kawamata, J.; Konishi, G.-I. A Novel Pyrene-Based Two-Photon Active Fluorescent Dye Efficiently Excited and Emitting in the “Tissue Optical Window (650–1100 Nm).” *J. Mater. Chem. B* **2014**, *3*, 184–190.

- (15) Suzuki, Y.; Moritomo, H.; Fuji, A.; Satomi, K.; Kawamata, J.; Yamamoto, M.; Hasegawa, Y. Three-Photon-Induced Luminescence of Europium Acetylacetonate-Type Complexes. *Chem. Lett.* **2016**, *45*, 538–540.
- (16) Kim, H. M.; Cho, B. R. Small-Molecule Two-Photon Probes for Bioimaging Applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 5014–5055.
- (17) Day, P.; Sanders, N. The Spectra of Complexes of Conjugated Ligands. Part II. Charge-Transfer in Substituted Phenanthroline Complexes: Intensities. *J. Chem. Soc., A* **1967**, 1536.
- (18) Moritomo, H.; Nakagawa, K.; Sugihara, H.; Suzuki, Y.; Kawamata, J. Two-Photon Absorption (TPA) Spectra of Tris(4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthroline)Metal(II) Perchlorate: Drastic Effects of Central Metal(II) Ions on TPA Cross Section. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 441–443.

2章 イリジウム錯体の二光子吸収特性と フェムト秒ファイバーレーザーを用いた 酸素センシング

2.1. 導入

第1章でも述べたように、1030 nm で発振するフェムト秒ファイバーレーザーで二光子励起が可能な化合物の一光子吸収帯は 500 – 600 nm 付近に位置している。その波長域に吸収帯が存在する化合物を得る手法として、遷移金属錯体が示す MLCT の利用を着想した。そこで本研究では、波長 500 – 600 nm 付近に MLCT を示し、かつ生体中で発光を示す金属錯体を探索し、

図 2 -1 に 構造 を 示 す Ir 錯 体
(2,4-pentanedionato- $\kappa O^2, \kappa O^4$)-bis-[2-(6-phenanthridinyl- κN)benzo[*b*]thien-3-yl- κC]iridium

(BTPHSA)に着目した。この錯体は、生体中の酸素濃度のマッピング用プローブであることが知られている¹。本研究では、BTPHSA の二光子吸収特性を調査し、さらに BTPHSA をプローブとして Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起イメージングを行うことで、有機小分子よりも分子設計の自由度が高い金属錯体も Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源とした二光子励起蛍光顕微鏡観察に用いるプローブとして利用可能であることを実証することを目指した。

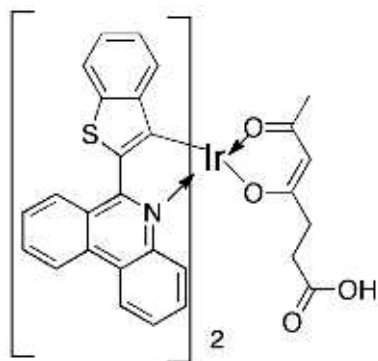


図 2-1 BTPHSA の構造式

2. 2. 実験

2. 2. 1. 試料

BTPHSA は、群馬大学理工学府、飛田成史教授らのグループからご提供頂いた。

2. 2. 2. 光学測定

紫外-可視吸収スペクトルは V-670-UV-VIS-NIR spectrophotometer (Jasco Co.) と 1 cm の石英セルを用いて測定した。BTPHSA は、dimethylsulfoxide (DMSO) に $3.94 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ となるよう溶解させて測定溶液とした。発光スペクトルおよび発光量子収率は、絶対蛍光量子収率測定装置 (Hamamatsu Photonics K. K., C9920-03G) を用いて測定した。測定に用いた BTPHSA の DMSO 溶液の濃度は、 $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ とした。脱酸素条件下で測定をする際は、溶液を窒素で 30 分間バブリングして脱気した。

本研究では、二光子誘起発光法を用いて二光子吸収スペクトルを測定した²。この方法は、あらかじめ二光子吸収断面積がわかっている化合物を参照試料とし、測定試料との観測された発光の強度の比をとることで、二光子吸収断面積を測定する方法である。この測定において、試料の二光子吸収断面積は、以下の式を用いて表される。

$$\sigma_s^{(2)} = \frac{n_s I_s C_r \Phi_r}{n_r I_r C_s \Phi_s} \sigma_r^{(2)}$$

ここで、 n 、 I 、 C 、 Φ 、 $\sigma^{(2)}$ はそれぞれ屈折率、発光強度、試料溶液の濃度、発光量子収率、二光子吸収断面積であり、添字の s と r はそれぞれ測定試料、参照試料を表している。本研究では、二光子吸収断面積が報告されている PY³ を参照試料として用いている。Ti: Sapphire レーザー (Tsunami, Spectra-Physics) からのレーザー光をフェムト秒再生増幅器 (Spitfire, Spectra-Physics) により繰り返し周波数 1 kHz のレーザーに増幅し、光パラメトリック発振器(OPA-800C, Spectra-Physics) により波長変換した光を用いた。焦点距離 8 cm のレンズで集光したレーザー光を試料に入射し、試料からの発光を分光器 (リッパ応用光学株式会社、MC-25N) 及び液体窒素冷却 CCD カメラ (Princeton Instruments inc.、LN/CCD-1100PB) で検出した。露光時間は 5 秒、スリット幅は 250 μm と設定した。参照試料の PY、測定試料の BTPHSA は、DMSO にそれぞれ濃度 1.12×10^{-4} 、 $8.10 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ となるよう溶解させて測定溶液とした。励起光強度に対して発光強度が二乗依存性を示すパワー領域で、断面積の値を求めた。二乗依存性が観察される入射光強度では、純粋に二光子吸収現象のみを観察していることになる。

一光子励起、二光子励起発光スペクトルの測定は、 $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ の BTPHSA の DMSO 溶液を用いた。光源として一光子励起には 365 nm の UV ライト、二光子励起には光パラメトリック発振器(OPA-800C, Spectra-Physics)の波長 1030 nm の光を、それぞれ用いた。BTPHSA からの発光は、USB 分光器により検出した。

2. 2. 3. 細胞の培養と染色

細胞としては、ヒト胎児腎由来の HEK293 細胞を用いた。HEK293 細胞は、10%(v/v)

のウシ胎児血清、1%のトリプシン及びストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル (DMEM) 中、5%CO₂ 条件下で培養した。蛍光顕微鏡観察を行う試料には、HEK293 細胞を 35 mm グラスベースディッシュへ継代したものをを用いた。フェノールレッド不含 DMEM 培地 2 mL に BTPHSA の 1 mmol dm⁻³ の DMSO 溶液を 2 μL 添加したものをディッシュにロードし、12 時間インキュベートすることで染色を行った。蛍光顕微鏡観察の直前に、BTPHSA を含む培地をディッシュより取り除き、リン酸緩衝液を用いて 2 回細胞を洗浄し、フェノールレッド不含 DMEM 培地 2mL をディッシュに加えた。各染色用色素 4',6-diamidino-2- phenylindole (DAPI) と二重染色を行う際は、BTPHSA により染色した後に 0.5 μmol dm⁻³ の水溶液をディッシュにロードし、10 分間インキュベートした。

2. 2. 4. 一光子励起蛍光顕微鏡観察

一光子励起蛍光顕微鏡観察には、CCD カメラ DS-Ril (Nikon) を搭載した ECRIPSE50i (Nikon) を用いた。DAPI からの蛍光は UV-2A のフィルターキューブ (励起フィルター 330-380 nm、ダイクロイックミラーカットオン波長 400 nm、バリアフィルター 590 nm)、BTPHSA からの発光は G-2A (励起フィルター 510-560 nm、ダイクロイックミラーカットオン波長 565 nm、バリアフィルター 590 nm) を通して検出した。対物レンズには倍率 100 倍、N. A. = 1.2 の油浸レンズを用いた。

2. 2. 5. 多光子励起蛍光顕微鏡観察

Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを搭載した多光子励起蛍光顕微鏡は現在市販されていないため、本研究では自作した多光子励起蛍光顕微鏡を用いた。励起光源として L12948 (Hamamatsu Photonics)、ガルバノスキャナとして C10516

(Hamamatsu Photonics) を用いた。BTPHSA からの発光は、フォトンカウンティングヘッド H7421-40 (Hamamatsu Photonics) により検出した。対物レンズには倍率 60 倍、N. A.=1.4 の油浸レンズを用いた。

2. 3. 結果と考察

2. 3. 1. 一光子吸収・二光子吸収特性

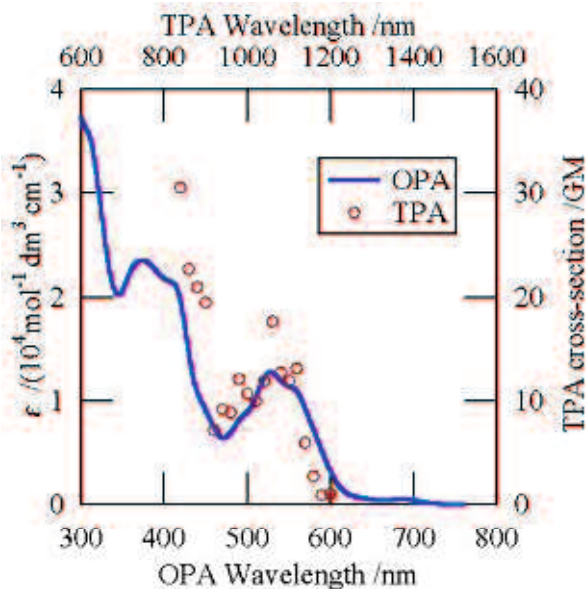


図 2-2 BTPHSA の DMSO 溶液の一光子吸収スペクトル (OPA; 縦軸左、横軸下) と二光子吸収スペクトル (TPA; 縦軸右、横軸上)

BTPHSA の DMSO 溶液の一光子吸収スペクトル、二光子吸収スペクトルを重ねたものを図 2-2 に示す。一光子吸収スペクトルにおいては、縦軸左にモル吸光係数を、横軸下に波長をとっている。二光子吸収スペクトルにおいては、二光子吸収断面積を縦軸右に、波長を横軸上に示している。ここで、二光子吸収スペクトルの横軸は、一光子吸収スペクトルの横軸のちょうど倍となるようにしている。一光子吸収帯は、300 - 600 nm に観察され、450 - 600 nm に現れたモル吸光係数 10000 程度の吸収帯は、MLCT に帰属された¹。BTPHSA の MLCT 帯の波長域である、500 - 600 nm のちょうど倍の波長域 1000 - 1200 nm に二光子吸収帯が観察された。この理由は、BTPHSA の分子構造の対称性が低いため、一光子励起過程、二光子励起過程のどちらの場合で

も同じ励起準位に遷移するためであると考えられる⁴。二光子吸収極大波長 1050 nm における二光子吸収断面積は、18 GM であった。また、二光子吸収断面積の最大値は、810 nm において 30 GM であった。波長 900 nm 以下の波長域での二光子吸収断面積の急激な上昇は、二重共鳴現象に起因するものであった⁵⁻⁷。さらに大きな二光子吸収断面積が波長 840 nm 以下の波長域で観測されることが予想されるが、この波長域では、二光子吸収測定に一光子吸収が重なってしまうため、二光子吸収断面積を測定することができなかった。

2. 3. 2. 発光特性

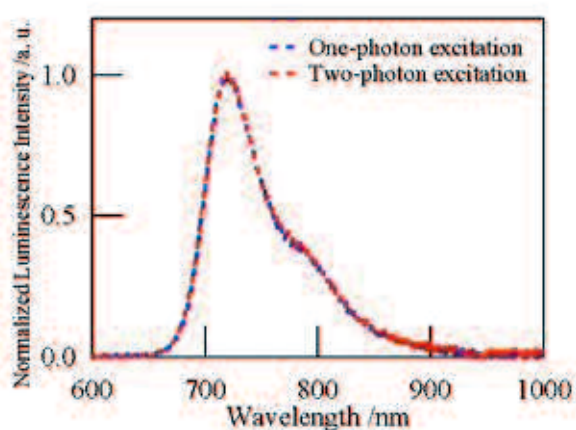


図 2-3 BTPHSA の DMSO 溶液の一光子励起（青）、二光子励起（赤）発光スペクトル

一光子及び二光子励起発光スペクトルを重ねたものを図 2-3 に示す。発光極大波長は、一光子励起、二光子励起のどちらの場合でも 712 nm に観察され、発光スペクトルの形状も事実上同じであった。このことから、BTPHSA は、一般的な発光性材料と同様に、一光子励起、二光子励起どちらの場合でも同じ励起準位から発光することを示しており⁸、上述の吸収スペクトルの形状についての議論ともつじつまがあった。

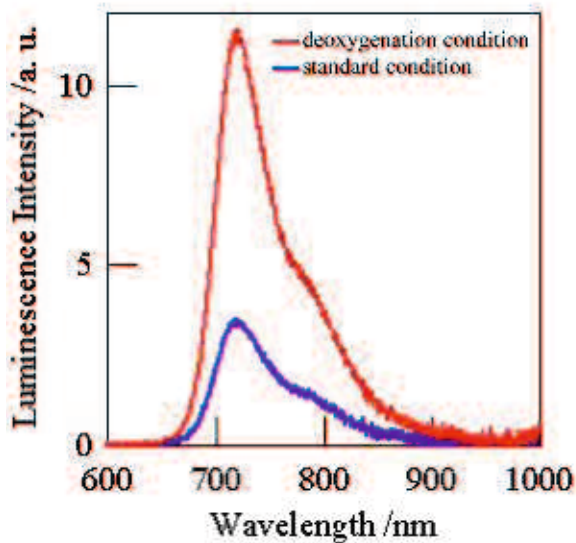


図 2- 4 BTPHSA の DMSO 溶液の脱酸素化および常酸素雰囲気下の二光子励起発光スペクトル

BTPHSA を用いれば一光子励起蛍光顕微鏡下での生体中の酸素濃度のマッピングを行うことができる。二光子励起蛍光顕微鏡下で酸素濃度の高低をモニターできるかどうかを確かめるために、二光子励起発光強度の酸素応答性を調査した。BTPHSA の DMSO 溶液の脱酸素条件下および大気雰囲気下での発光スペクトルを図 2- 4 に示す。脱酸素条件下での二光子励起発光強度は、常酸素雰囲気下と比べおおよそ 4 倍強かった。このことから、BTPHSA は脱酸素条件下では、一光子励起のときだけでなく、二光子励起でも強いりん光を示すことが明らかになった。また、BTPHSA の DMSO 中での一光子励起発光量子収率は、常酸素雰囲気下で 0.08 であったのに対し、脱酸素条件下では 0.31 とおおよそ 4 倍大きかった。この発光量子収率の増加傾向は、二光子励起発光強度の増加傾向とほぼ同じであった。

2. 3. 3. 一光子励起蛍光顕微鏡観察

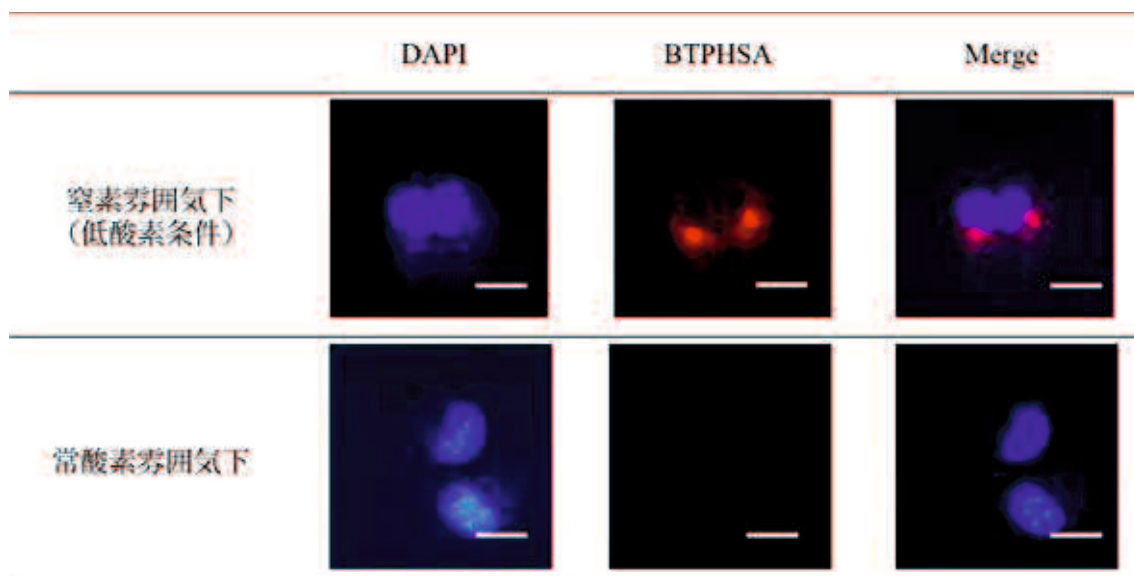


図 2-5 窒素雰囲気下(上段)および常酸素雰囲気下(下段)における BTPHSA と DAPI により染色された HEK293 細胞の一光子励起蛍光顕微鏡画像 (スケールバー; 25 μm)

BTPHSA が細胞中のどの部分に局在するかを確かめるために、BTPHSA と DAPI により染色された HEK293 細胞の一光子励起蛍光顕微鏡画像を撮影した。得られた画像を図 2-5 に示す。窒素雰囲気では、BTPHSA 由来の赤色発光が細胞中より観察され、その発光は DAPI 由来の青色発光とは重なり合っていなかった。このことから、BTPHSA は、細胞中に取り込まれた上で、核ではなく細胞質や小胞体に局在していることが示唆された。また、窒素雰囲気下とは対照的に、常酸素雰囲気化では、BTPHSA 由来の発光は酸素により消光されて検出されなかった。

2. 3. 4. 二光子励起蛍光顕微鏡観察

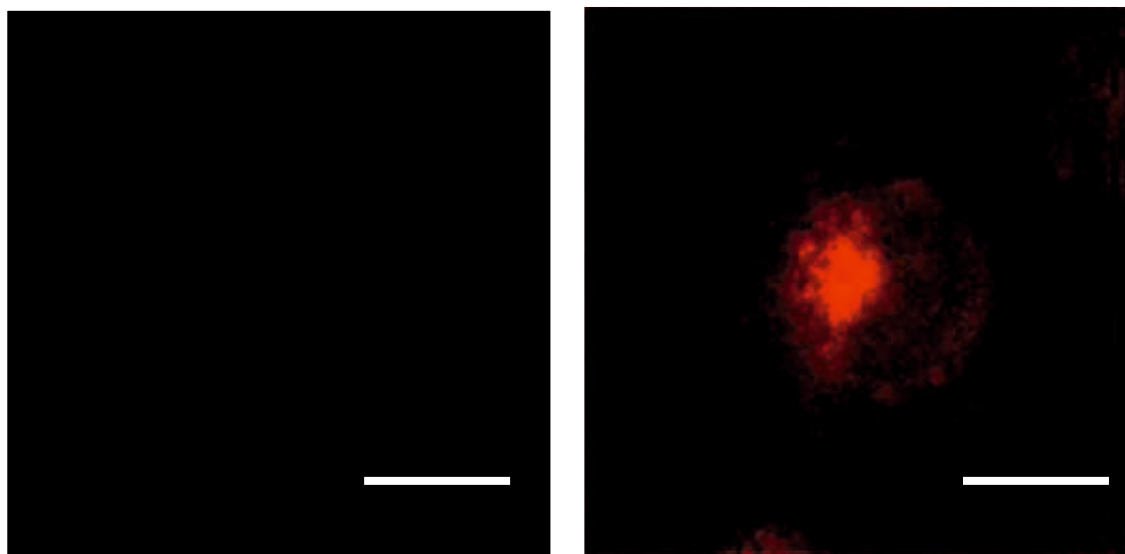


図 2-6 BTPHSA により染色された HEK293 細胞の常酸素条件下（左）と窒素雰囲気下（右）における二光子励起蛍光顕微鏡画像

BTPHSA により染色された HEK293 細胞のフェムト秒ファイバーレーザーを光源に用いた二光子励起イメージを図 2-6 に示す。得られた画像は、一光子励起蛍光顕微鏡により撮影されたものと本質的に同じであった。したがって、BTPHSA をプローブに用いることで、低酸素下にある細胞のイメージングを二光子励起蛍光顕微鏡でも実証することができた。このとき、像を得るために必要とした励起光強度は、10 mW であり、細胞へのダメージを十分抑えられることが分かった。このように、波長 500 – 600 nm に MLCT を示す発光性金属錯体を設計、あるいは選択をすることで、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源とした二光子顕微鏡用のプローブを得ることができる。

2. 4. 結論

本研究では、金属錯体の MLCT、または LMCT 帯を上手く利用することで、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを用いた二光子イメージング可能なプローブが得られることを示すため、500 - 600nm に MLCT 帯を有する Ir 錯体 BTPHSA に着目してその二光子吸収特性を評価した。その結果、二光子吸収帯は 800 - 1200 nm に観測され、二光子吸収断面積の極大値は 1030 nm で 18 GM、最大値は 810 nm で 31 GM であった。さらに、BTPHSA をプローブとすることで、低酸素環境下にある HEK293 細胞の二光子励起イメージを、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを用いて撮影することができた。BTPHSA に限らずとも、波長 500 - 600 nm 付近に MLCT または LMCT を示す発光性金属錯体を設計、あるいは選択をすれば Yb-dope 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と考えられる。そのような金属錯体ベースのプローブはこれまでも多く開発されているため、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源とした二光子イメージングに用いることのできるプローブの選択の幅が大きく広がったといえる。

2. 5. 参考文献

- (1) Zhang, S.; Hosaka, M.; Yoshihara, T.; Negishi, K.; Iida, Y.; Tobita, S.; Takeuchi, T. Phosphorescent Light-Emitting Iridium Complexes Serve as a Hypoxia-Sensing Probe for Tumor Imaging in Living Animals. *Cancer Res* **2010**, *70*, 4490–4498.
- (2) Xu, C.; Webb, W. W. Measurement of Two-Photon Excitation Cross Sections of Molecular Fluorophores with Data From 690 to 1050 Nm. *J. Opt. Soc. Am. B, JOSAB* **1996**, *13*, 481–491.
- (3) Niko, Y.; Moritomo, H.; Sugihara, H.; Suzuki, Y.; Kawamata, J.; Konishi, G.-I. A Novel Pyrene-Based Two-Photon Active Fluorescent Dye Efficiently Excited and Emitting in the “Tissue Optical Window (650–1100 Nm).” *Journal of Materials Chemistry B: Materials for biology and medicine* **2014**, *3*, 184–190.
- (4) Peticolas, W. L. Multiphoton Spectroscopy. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1967**, *18*, 233–260.
- (5) Moritomo, H.; Nakagawa, K.; Sugihara, H.; Suzuki, Y.; Kawamata, J. Two-Photon Absorption (TPA) Spectra of Tris(4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthroline)Metal(II) Perchlorate: Drastic Effects of Central Metal(II) Ions on TPA Cross Section. *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 441–443.
- (6) Hirakawa, S.; Kawamata, J.; Suzuki, Y.; Tani, S.; Murafuji, T.; Kasatani, K.; Antonov, L.; Kamada, K.; Ohta, K. Two-Photon Absorption Properties of Azulenyl Compounds Having a Conjugated Ketone Backbone. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 5198–5207.
- (7) Kamada, K.; Ohta, K.; Iwase, Y.; Kondo, K. Two-Photon Absorption Properties of Symmetric Substituted Diacetylene: Drastic Enhancement of the Cross Section Near the One-Photon Absorption Peak. *Chemical Physics Letters* **2003**, *372*, 386–393.

- (8) Kasha, M. Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules. *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 14.

3章 Yb-dope ファイバーレーザーによる 三光子励起蛍光イメージングのための蛍 光プローブ選択指針

3. 1. 導入

2章で着目した Ir 錯体 BTPHSA の Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーの発信波長である 1030 nm における二光子吸収断面積の値は、これまで Ti: sapphire レーザーを光源として開発されたプローブ¹と比べると 1 ケタ程度小さかった。しかし、励起光強度が 10 mW と低くても、二光子励起イメージを撮影することができた。これは、蛍光イメージングに用いる対物レンズでは、焦点に強く励起光が絞られるためである。そのように強く励起光が絞られる条件下では、二光子吸収のみならず、より発生確率の低い三光子吸収も生じることを報告している²。この知見に基づき、高効率に三光子吸収を示す蛍光プローブを用いれば、10 mW 程度の入射光強度で三光子励起蛍光イメージングが行えると考えた。

選択則に基づけば、最低一光子許容準位と、最低三光子許容準位は同じである。したがって、1030–1050 nm において高効率に三光子吸収を示す化合物は、そのおおよそ 1/3 の波長域である 330–350 nm 付近に吸収帯を示すはずである。したがって、330–350 nm 付近におけるモル吸光係数と蛍光量子収率の積の値（一光子励起蛍光効率）が大きい化合物は、1030 nm において高効率に三光子励起発光を示すと考えられる³。しかしながら、三光子吸収の発生確率は二光子吸収と比べると桁違いに小さく、観測が難しいため、この指針の実験的な検証は、まだ行なわれていなかった^{4,5}。そこで、本研究では、自ら開発した i) 330 - 350 nm 付近のモル吸光係数が比較的大きい、ii) 蛍

光量子収率が比較的高い、iii) ミトコンドリアに局在する、という特徴を有する3種のピリジニウム誘導体を選び、それらの一光子吸収、蛍光特性と三光子励起発光効率の相関を実験的に調査し、三光子励起を利用した Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起三光子蛍光イメージングのための分子設計指針を確立することを目的とした。

本研究で選んだ3種のピリジニウム誘導体 1-methyl-4-[(1E)-2-phenylethenyl]pyridinium iodide (monoBP)、4, 4'-(9,9-dimethyl-9H-fluorene-2,7-diyl)dipyridinium iodide (FLJ)、4, 4'-(2, 6-naphthalenediyl)dipyridinium iodide (NPJ)の構造式を図 3-1 に示す。これらの化合物を用いた Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起三光子イメージング、そして 1030 nm における三光子励起蛍光効率の見積もりにより、三光子イメージングのための分子の選択指針を打ち出すこととした。

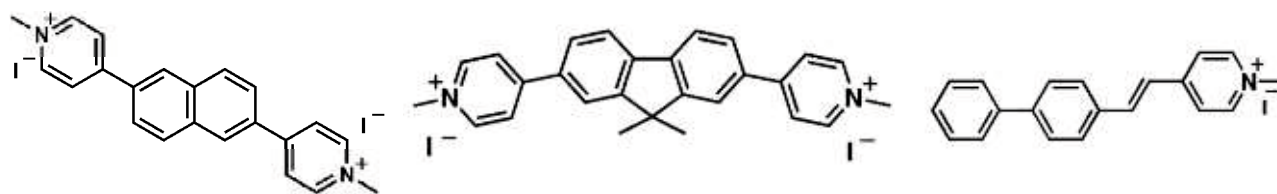


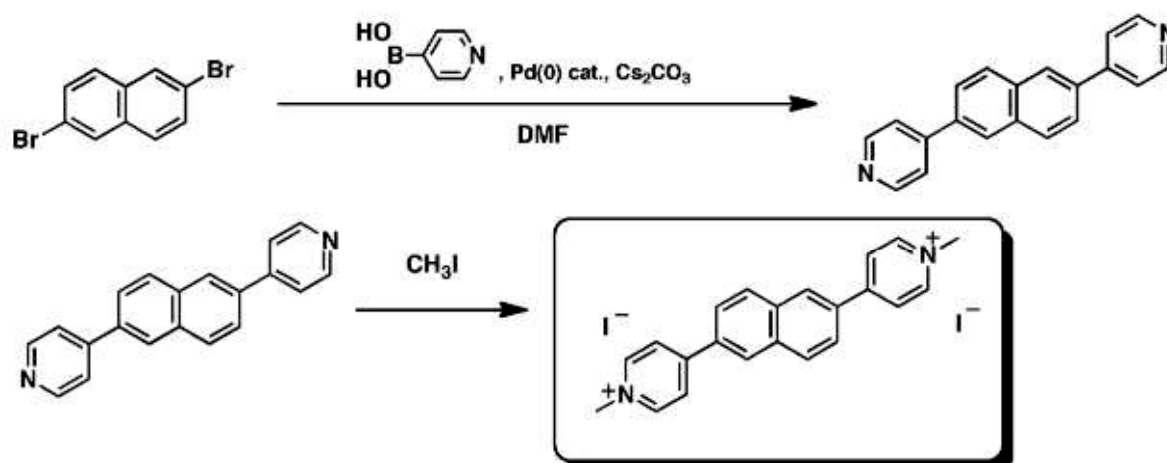
図 3-1 NPJ(左)、FLJ (中央)、monoBP (右) の構造式

3. 2. 実験

3. 2. 1. 試料

各化合物は、当研究室の藤木祥平氏、斎藤貴子氏が合成したものを使用した。以下、同氏らの卒業論文から引用した合成経路、手順を示す。

NPJ は以下のスキームに従って合成をした。



スキーム 3-1 NPJ の合成経路

4,4'-(2,6-naphthalenediyl)dipyridine の合成

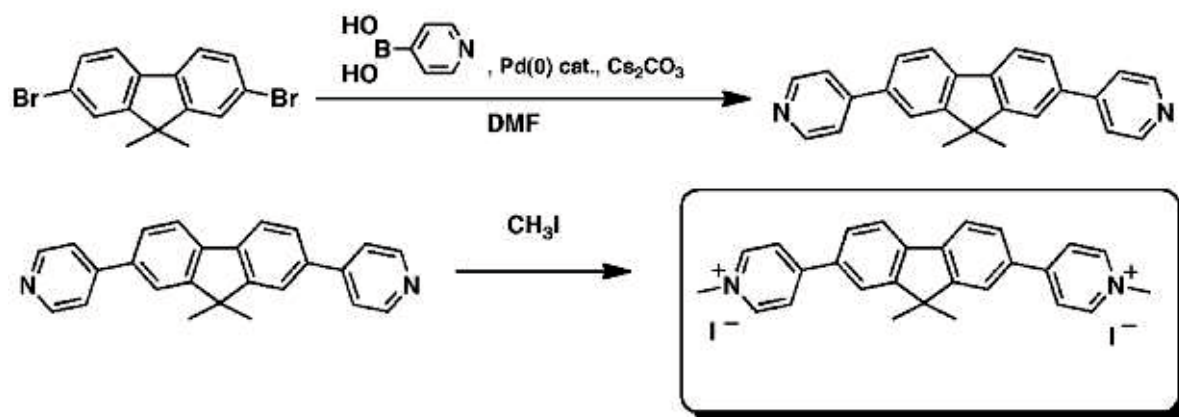
50 mL のシュレンク管をフレイムドライし、2,6-dibromonaphthalene (1 mmol、0.28 g)、4-pyridyl bromic acid (2.2 mmol、0.30 g)、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.0005 mmol、0.008 g)、cesium carbonate (2 mmol、0.8 g) を加え、アルゴン置換した。窒素によりバブリングをして脱気した *N,N*-dimethylformamide (DMF) 12 mL を加え、110°C で 46 時間、加熱・攪拌した。加熱攪拌を開始した直後は反応溶液は白濁し、器壁に白色の固体が付着していた。加熱攪拌 20 時間後から白濁していた溶液が黄色

に変化していき、次第に黒褐色と変化した。反応の終了は、薄層クロマトグラフィー (TLC) 上でスポットの変化がみられなくなったところとした。このときの展開溶媒は、クロロホルム : アセトン = 7 : 3 の混合溶媒を用いた。反応終了後、ロータリーエバポレーターで反応溶液から DMF を取り除き、黒褐色の固体を得た。黒褐色の固体を、クロロホルム中に分散させ、目的化合物のみをクロロホルムに溶解させた。その溶液を吸引ろ過し、ろ液を水で洗浄して有機層をロータリーエバポレーターにて濃縮して粗結晶を得た。得られた粗結晶は、カラムクロマトグラフィーにより精製した。このときの展開溶媒は、TLC を行うときと同じ組成の混合溶媒を用いた。収率 71%。¹H NMR (400 MHz、重クロロホルム (CDCl₃) -d₆) δ (ppm): 8.74 (d, *J*=6.0 Hz, 4H)、8.17 (s, 2H)、8.07 (d, *J*=8.4 Hz, 2H)、7.84 (d, *J*=8.4 Hz, 2H)、7.67 (t, *J*=1.6, 4.4 Hz, 4H)

NPJ の合成

4,4'-(2,6-naphthalenediyl)dipyridine (0.20 g) をジクロロメタンに溶解し、そこに methyl iodide (2 mL) を加え、常温で 24 時間、攪拌した。析出した黄色の粉末を吸引ろ過により回収した。得られた粉末をジクロロメタンで洗浄し、その後メタノールによって再結晶することにより NPJ を得た。収率 65%。¹H NMR (400 MHz、DMSO-d₆) δ (ppm): 9.11(d, *J*=6.8 Hz, 4H)、8.88 (s, 2H)、8.68 (d, *J*=7.2 Hz, 4H)、8.35 (d, *J*=8.8 Hz, 2H)、8.30 (dd, *J*=1.6, 8.8 Hz, 2H)、4.37 (s, 6H)

FLJ は以下のスキームに従って合成をした。



スキーム 3-2 FLJ の合成経路

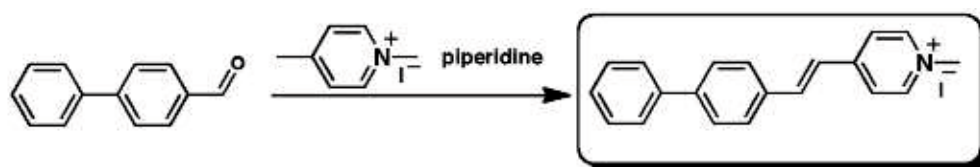
4,4'-(9,9-dimethyl-9H-fluorene-2,7-diyl)bis(1-methylpyridinium)の合成

50 mL のシュレンク管をフレイムドライし、2,7-dibromo-9,9-dimethylfluorene (2 mmol、0.70 g)、4-pyridyl bromic acid (6 mmol、0.73 g)、cesium carbonate (5 mmol、1.66 g)、触媒量の tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)を加え、アルゴン置換した。窒素によりバブリングをして脱気した DMF を 25 mL を加え、110°C で 46 時間、加熱・攪拌した。反応の終了は、薄層クロマトグラフィー (TLC) 上でスポットの変化がみられなくなったところとした。反応終了後、ロータリーエバポレーターで反応溶液から DMF を取り除き、黒褐色の固体を得た。黒褐色の固体を、クロロホルム中に分散させ、目的化合物のみをクロロホルムに溶解させた。その溶液を吸引ろ過し、ろ液を水で洗浄して有機層をロータリーエバポレーターにて濃縮して粗結晶を得た。得られた粗結晶をアセトニトリルで再結晶し、目的化合物を得た。収率 60%。¹H NMR (400 MHz、DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.65 (d, 4H)、8.00 (d, *J*=7.2 Hz, 2H)、7.95 (s, 2H)、7.79-7.84(m, 2H)、1.60 (s, 6H)

FLJ の合成

4,4'-(9,9-dimethyl-9*H*-fluorene-2,7-diyl)bis(1-methylpyridinium) (0.5 mmol) をジクロロメタンに溶解させた溶液に、methyl iodide を 1 mL 加え、12 時間攪拌した。析出した固体をろ過し、アセトンで再結晶を行い、黄色の結晶を得た。収率 90%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.04 (d, $J=5.2$ Hz, 4H)、8.63 (d, $J=5.2$ Hz, 4H)、8.44 (s, 2H)、8.26 (d, $J=6.4$ Hz, 2H)、8.19 (d, $J=6.4$ Hz, 8.8 Hz, 2H)、8.17 (d, $J=1.6$ Hz, 8.8 Hz, 2H)、4.35 (s, 6H) 1.64 (s, 6H)

mono BP は以下の反応で合成した。



スキーム 3-3 monoBP の合成

3. 2. 2. 光学測定

紫外-可視吸収スペクトル、蛍光スペクトル、蛍光量子収率の測定は 2 章と同じ装置を用いて行った。NPJ、FLJ、monoBP は、それぞれ水に 2.19×10^{-5} mol dm⁻³、 1.95×10^{-5} mol dm⁻³、 1.05×10^{-5} mol dm⁻³ となるよう溶解させて紫外-可視吸収スペクトルの測定溶液とした。蛍光スペクトルの測定には、NPJ、FLJ、monoBP の 1×10^{-5} mol dm⁻³ の水溶液を用いた。

3. 2. 3. 多光子励起蛍光顕微鏡観察

2 章と同じ測定系により測定を行った。

3. 2. 4. Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーを励起光源としたときの励起過程の決定

多光子励起蛍光顕微鏡のサンプルステージに各化合物の色素の濃度 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ の水溶液を封入したガラスベースディッシュを設置し、倍率 60 倍、N. A=1.4 の対物レンズにより Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーからのレーザー光を集光して溶液に照射した。このときの励起光強度は、ガルバノスキャナの手前に挿入する R フィルターの枚数を変更させることで変化させた。R フィルター 1030 nm における実際の透過率は 90% である。したがって、R フィルターを 1 枚挿入するごとに、励起光を 10% ずつ減衰させることができるため、可変 ND フィルターを用いた場合より正確に励起光強度を見積もることができる。測定の様子を図 3-2 に示す。

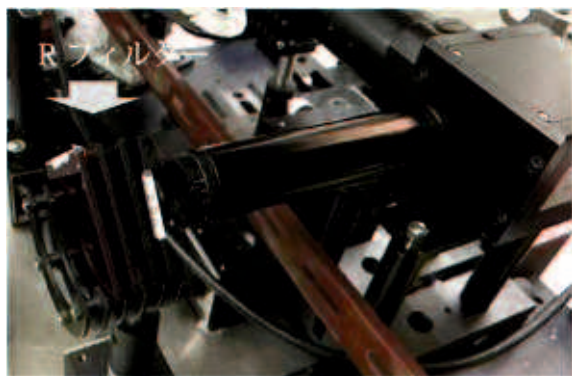


図 3-2 ガルバノスキャナの手前に挿入された IR フィルター

各励起光強度における溶液から生じた蛍光強度は、取得した画像から見積もった。各励起光強度条件で 5 枚画像を撮影し、1 枚ごとの画像の輝度の平均値を画像処理ソフト image J を用いて数値化した。数値化された 5 枚の画像の輝度の平均値を、その励起光強度における蛍光強度とした。

3. 3. 結果と考察

3. 3. 1. 一光子吸収、蛍光スペクトル

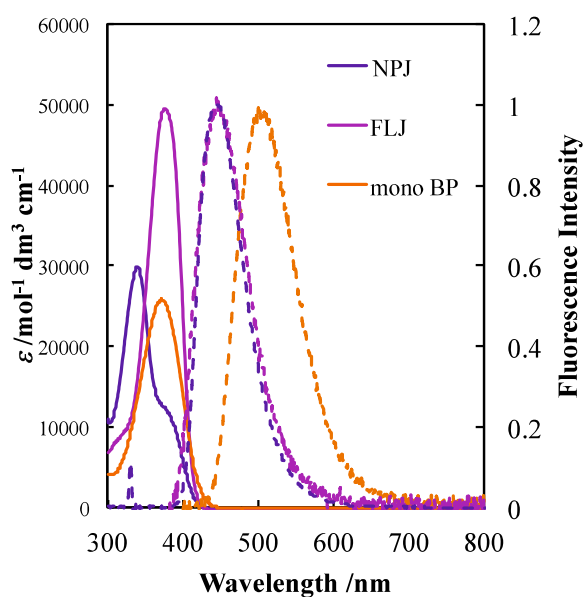


図 3-3 NPJ、FLJ、monoBP の水溶液の一光子吸収及び蛍光スペクトル

表 3-1 各化合物の水溶液の吸収極大、波長 340 nm におけるモル吸光係数と蛍光量子収率および波長 340 nm における一光子励起蛍光効率

化合物	吸収極大波長 /nm	ϵ at 340 nm ($\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$)	蛍光量子収率 (ϕ)	$(\epsilon \text{ at } 340 \text{ nm}) \times \phi$
NPJ	344	29800	0.92	27400
FLJ	384	16000	0.80	12800
monoBP	382	14700	0.32	4150

各化合物の水溶液の吸収、蛍光スペクトルを図 3-3 に示す。吸収極大波長、波長 340

nm におけるモル吸光係数、蛍光極大波長、蛍光量子収率は表 3-1 にまとめた。今回取り上げた全ての化合物の吸収帯は、330–350 nm 付近に位置しており、1030 nm において三光子吸収が効率よく生じることが想定される。また、波長 340 nm における一光子励起蛍光効率の序列は、NPJ、FLJ、monoBP であった。したがって、本研究で取り扱う化合物の三光子励起蛍光効率の序列も、この順になることが想定される。

3. 3. 2. 多光子励起蛍光顕微鏡観察

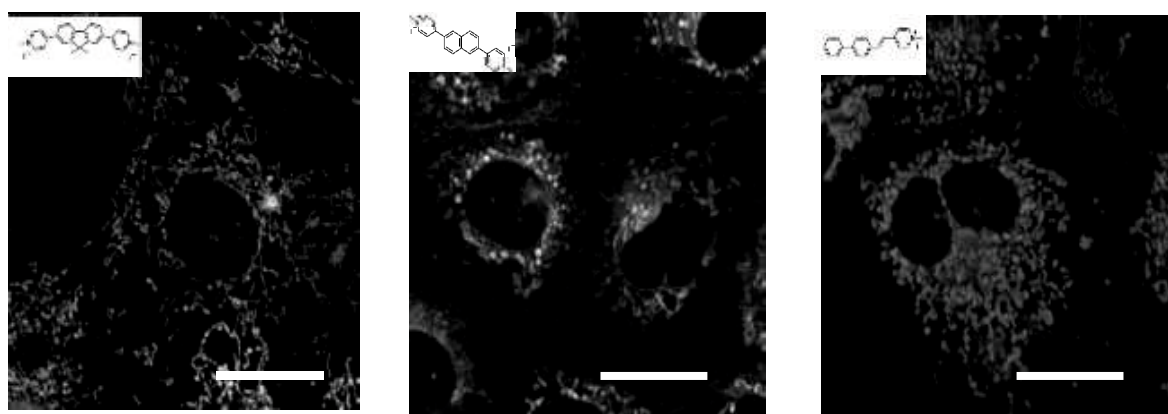


図 3-4 NPJ、FLJ、monoBP により染色された HEK293 細胞の多光子励起蛍光イメージ (スケールバー; 25 μm)

各化合物により染色された HEK293 細胞の多光子励起蛍光顕微鏡画像を図 3-4 に示す。このときに必要な励起光強度は 10 mW と、第 2 章での二光子励起イメージングとほぼ同じ強度であった。どの化合物を用いても、細胞中のミトコンドリアを明瞭に観察することができた。

3. 3. 3. 1030 nm における励起過程の調査

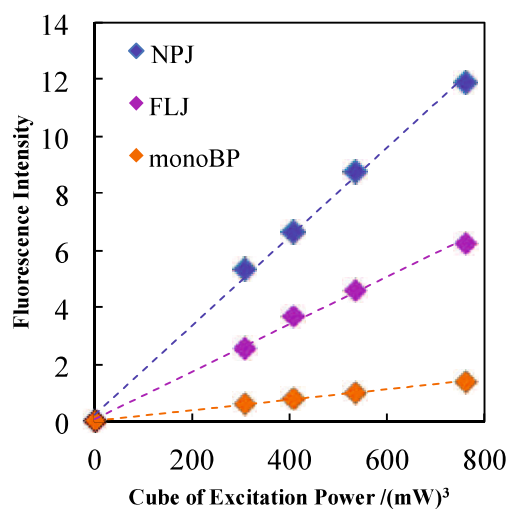


図 3-5 蛍光強度の励起光強度依存性

波長 1030 nm における励起過程が三光子吸収かどうかを確かめるため、励起光強度の 3 乗に対して蛍光強度をプロットした。得られた結果を図 3-5 に示す。一般的に、化合物が n 光子吸収過程を経て蛍光を発する場合、その蛍光強度は励起光強度の n 乗に依存する⁶。どの化合物の蛍光強度も、励起光強度の 3 乗に対して直線的に増加していた。このことは、本研究でモデルとして選んだプローブは、1030 nm において確かに三光子吸収過程により蛍光を生ずることを示している。したがって、図 3-4 の蛍光顕微鏡画像は、確かに三光子励起蛍光顕微鏡画像であることが明らかになった。

3. 3. 4. 三光子励起蛍光効率の見積もり

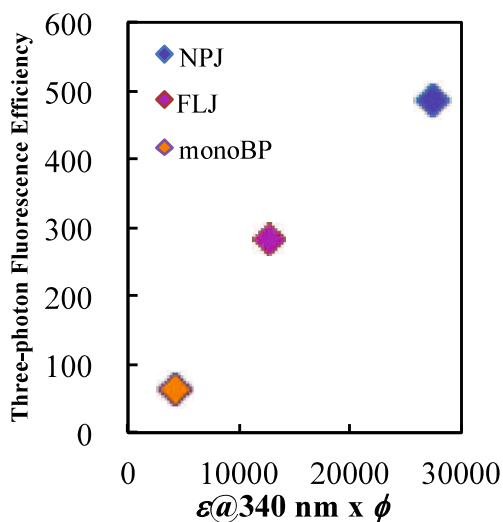


図 3-6 三光子励起蛍光効率と一光子励起蛍光効率の関係

図 3-5 に示した蛍光強度の励起光強度の 3 乗に対するプロットの傾きは、各化合物の波長 1030 nm における三光子励起発光効率と、濃度の積に比例すると考えられる。そこで、1030 nm における三光子励起蛍光効率を見積もり、一光子励起蛍光効率との相関を調べるため、図 3-5 の直線の傾きを測定に用いた試料濃度で除した値を一光子励起蛍光効率に対してプロットした。得られた結果を図 3-6 に示す。確かに、一光子励起蛍光効率が高い化合物ほど、三光子励起蛍光効率も高いことが実験的に確かめられた。

3. 4. 結論

本研究では、Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザー励起三光子イメージングを行う際のプローブの選択指針を導くため、3 種のミトコンドリア染色用ピリジニウム誘導体を用いて、三光子励起蛍光イメージングを実証するだけでなく、プローブの一光子吸収、蛍光特性と三光子励起発光効率の相関を調査した。その結果、330 – 350 nm 付近に大きなモル吸光係数を持ち、かつ生体中で蛍光を示す化合物を選びさえすれば、10 mW 程度の入射光強度で三光子イメージを取得可能であることが明らかになった。この結果から、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のバリエーションを増やすことができるといえる。

3. 5. 参考文献

- (1) Kim, H. M.; Cho, B. R. Small-Molecule Two-Photon Probes for Bioimaging Applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 5014–5055.
- (2) Suzuki, Y.; Moritomo, H.; Fuji, A.; Satomi, K.; Kawamata, J.; Yamamoto, M.; Hasegawa, Y. Three-Photon-Induced Luminescence of Europium Acetylacetonate-Type Complexes. *Chem. Lett.* **2016**, *45*, 538–540.
- (3) Cronstrand, P.; Norman, P.; Luo, Y.; Ågren, H. Few-States Models for Three-Photon Absorption. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 2020.
- (4) Cohanoschi, I.; Belfield, K. D.; Toro, C.; Yao, S.; Hernández, F. E. The Impact of the Π -Electron Conjugation Length on the Three-Photon Absorption Cross Section of Fluorene Derivatives. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 194707.
- (5) Samoc, M.; Morrall, J. P.; Dalton, G. T.; Cifuentes, M. P.; Humphrey, M. G. Two-Photon and Three-Photon Absorption in an Organometallic Dendrimer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 731–733.
- (6) He, G. S.; Tan, L.-S.; Zheng, Q.; Prasad, P. N. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1245–1330.

4 章 総括

多光子励起蛍光顕微鏡の励起光源を Ti: sapphire レーザーから Yb-dope フェムト秒ファイバーレーザーへとシフトさせるため、観察に用いるためのプローブを選択する指針を世に打ち出すことを目指した。そこで本研究では i)波長 500 – 600 nm 付近に吸収帯を示すよう分子設計をしやすい金属錯体をプローブに用いること、ii)波長 300 – 400 nm 付近に一光子吸収帯を持つ蛍光プローブを三光子励起すること、という 2 つの戦略を提案し、第 2 章、第 3 章においてそれぞれその有効性を実証した。本研究で提案したプローブの選択指針はシンプルであるため、Yb-dope 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イメージングを行うにあたり目的に応じたプローブを簡単に選ぶことができるようになった。本研究で提案した指針に基づきプローブを選びさえすれば、多光子励起蛍光顕微鏡による生体臓器、組織の三次元的な観察を徹底的に温度や湿度が管理されたレーザー実験室ではなくとも、例えば手術室や動物実験室でも行うことができるようになる。したがって、これまでよりも多くの研究者が二光子励起蛍光顕微鏡の有用性を享受することができるようになる。本研究がもたらす多光子励起顕微鏡の汎用化は、ライフサイエンスの進展に大きく貢献するものと期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、主査として終始ご指導を下さいました山口大学大学院医学系研究科、川俣純教授に厚く御礼を申し上げます。また、同研究科鈴木康孝准教授には主指導教官、そして本論文の副査としてひとかたならぬお世話になりました。重ねてお礼を申し上げます。さらに、山口大学理工学研究科、谷誠治准教授には平素のセミナー及び研究活動にて大変有意義なコメントを頂きました。心から感謝申し上げます。

本論文を副査として御校閲下さり、丁寧な御助言を賜りました山口大学大学院医学系研究科、村藤俊宏教授、同大学院理工学研究科、山崎鈴子教授、綱島亮准教授に感謝を申し上げます。

イリジウム錯体 BTPHSA をご提供くださり、投稿論文の執筆の際には御意見、御助言を下さいました群馬大学理工学府、飛田成史教授、吉原利忠准教授に御礼を申し上げます。

研究を行ってきた5年間、研究室の諸先輩方、同期の皆様、そして後輩の皆様には大変お世話になりました。ここに御礼を申し上げます。

最後に、山口大学にて8年間の長きに渡り勉強する間、優しく見守り、多くの支援を下さった両親、そしてその他お世話になった多くの方々に御礼申し上げます。

本研究は、日本学術振興会特別研究員奨励費の助成を受けて行いました。

2017年2月

守友 博紀