

APPLICATION NOTE

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム A1R MP+/AX R MP

多光子励起顕微鏡を用いた、肝線維症の組織固有蛍光スペクトルに基づくデジタル病理学

近年、内臓脂肪の蓄積によって生じるメタボリックシンドロームの増加が問題となってきた。非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)、およびその重症型である非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) は、肝臓におけるメタボリックシンドロームであり、肝硬変・肝細胞がんに進展する。NAFLD/NASH における病態の正確かつ早期の診断技術の開発は重要な社会的課題である。

本アプリケーションノートでは、愛媛大学大学院医学系研究科 分子病態医学講座の齋藤卓先生、今村健志先生および消化器・内分泌・代謝内科の日浅陽一先生らにより開発された、肝線維症の定量的評価技術について紹介する。

キーワード：多光子励起顕微鏡、デジタル病理、肝線維症、自家蛍光

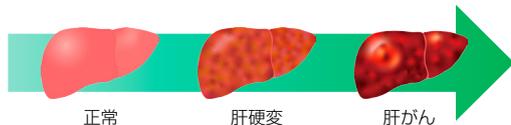
研究の概要

多細胞生物の細胞や組織には、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH)、フラビン、リポフスチン、メラニン、ポルフィリン、コラーゲン、エラスチン、ビタミンといった内在性の蛍光を発する化合物が多く含まれている。これらの分子は、組織の発達、恒常性、および疾患の進行に重要な役割を果たしているため、内在性蛍光分子の空間分布を観察することで、細胞や組織の状態を知ることができる。

多光子励起顕微鏡は、2光子3光子吸収の同時誘起による幅広い波長域での蛍光励起性能や、紫外領域に吸収ピークを持つ蛍光物質の励起能力などの理由から、多種成分からなる自家蛍光物質のイメージングに適している。しかしながら、組織観察で得られる自家蛍光は、一般に複数の異なる蛍光分子の混合物に由来する幅広いスペクトルプロファイルを示すために、個々の蛍光源を分離することは困難である。

齋藤先生らは、多光子励起顕微鏡を用いて個々の蛍光源を分離する代わりに、生体組織に付随する特徴的なスペクトルプロファイルを特定、画像領域分割法に応用し、さらに定量的な形態計測を行うことで肝線維症評価技術を開発した。

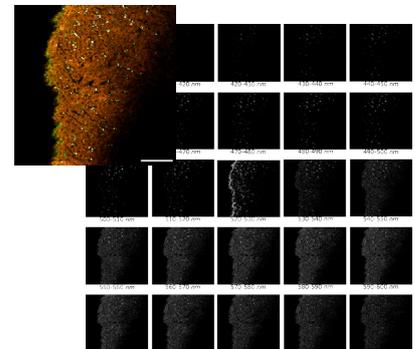
ここでは、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発性肝線維症のマウスモデルにおいて、自家蛍光に含まれる肝細胞代謝物、ビタミン、脂肪滴や炎症細胞の情報をスペクトル画像計測し、数値形態計測を行った報告を紹介する。



肝硬変・肝細胞がんの発症を抑制するために肝炎病態の正確かつ早期の診断技術の開発が必要である。

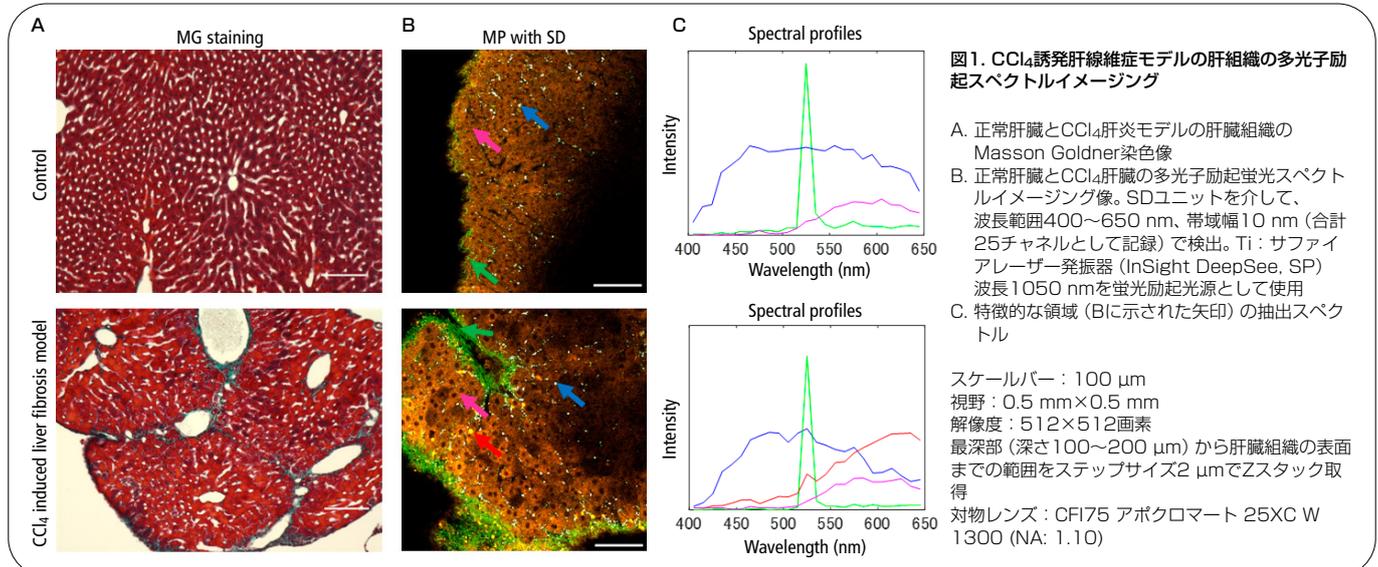
多光子励起される組織内在性蛍光物質

Molecule	Process	λ_{ex} (nm)
Tyrosine	3PE	<700
Tryptophan	3PE	700-740
Serotonin	3PE	700-720
Melatonin	3PE	700-720
5-HIAA	3PE	700-720
5-HTOL	3PE	700-720
Retinol	2PE	700-830
Flavins	2PE	700-730
NADH	2PE	690-730
Pyridoxine	2PE	690-710
Folic acid	2PE	700-770
Cholecalciferol	2PE	<700
Elastin	2PE	700-740
NFTs	2PE	700-780
Lipofuscin	2PE	700-850
Collagen	2PE	700-740
Microtubules	2PE	
Skeletal muscle	2PE	



各スペクトルバンドの多光子励起スペクトル画像
多光子励起蛍光スペクトル画像が有する多次的な生体情報を画像解析により抽出

参考：Zipfel, et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:7075-7080, 2003
Copyright (2003) National Academy of Sciences, U.S.A.



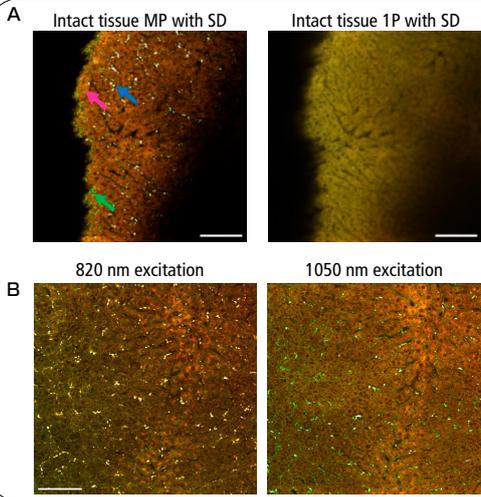


図2. 肝臓組織の自家蛍光計測の条件検討

- A. 多光子励起顕微鏡と共焦点顕微鏡を用いたマウス肝臓の自家蛍光スペクトル像の比較。
 多光子励起ではTi: サファイアレーザー発振器(波長1050 nm)を、1光子励起では4本の可視波長レーザーライン(405, 488, 561, および640 nm)を使用。
 青い矢印は白い点のような物質、緑の矢印は強いSHGシグナルの放出領域、マゼンタの矢印は主に肝細胞で構成される肝実質の領域を示す。
- B. 異なる3つの励起波長(820 nm, 1050 nm, 1200 nm)での多光子励起自家蛍光像の比較。NDDユニットを介して検出。発光フィルターセット:(1)二色性ミラー(DM)450 nmおよびバンドパスフィルター(BF)417/60 nm(中心波長/帯域幅),(2)DM 560 nmおよびBF 525/50 nm,(3)DM 662 nmおよびBF 617/73 nmを使用。
 スケールバー: 100 μ m

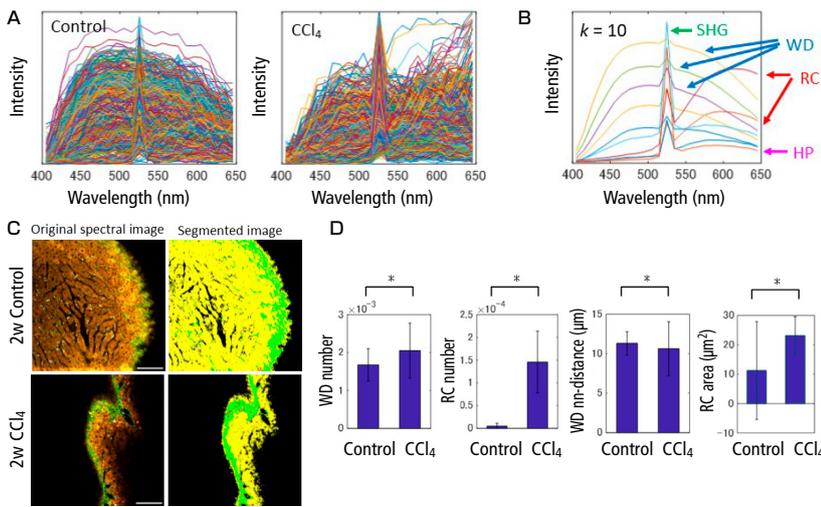


図3. スペクトル画像データの画像セグメンテーションと数学的形態分析

- A. 画像セットからFAST特徴量を利用してキーポイントを選定し、キーポイントから検出したスペクトルをプロファイル
- B. 10個に分類した内部マーカー。画像から抽出したスペクトルをもとにk-meansクラスタ法により代表的な10個のスペクトルを構成
 SHG: Second harmonic generation, WD: White dot, RC: Red cell, HP: Hepatic parenchyma
- C. 原画像とセグメンテーション画像の比較
 セグメンテーション画像において、HP: 黄色、SHG: 緑、WD: 白、RC: 赤で表示、スケールバー: 100 μ m
- D. セグメンテーション画像の数理形態解析結果
 左からWDサイト数、RC数、最近接WDサイト間距離、RC面積を、コントロールとCCl₄で比較

結果

1. 肝臓組織の自家蛍光を効果的に捉えるイメージング条件を同定

共焦点顕微鏡(レーザー波長: 405, 488, 561, 640nm)と多光子励起顕微鏡(レーザー波長: 820, 1050, 1200nm)を用いて、それぞれの励起条件で肝臓組織の自家蛍光像を比較した。その結果、近赤外光1050nmによる多光子励起イメージングが、肝細胞代謝亢進・肝星細胞が貯蔵する脂溶性ビタミン成分・肝障害に伴う炎症細胞を最も効率よく捉えた。正常肝臓組織とCCl₄肝炎モデルの肝臓組織を比較すると、肝炎モデルではコラーゲン線維(SHG)の増大、赤色の炎症細胞(Red cell; RC)の出現と白色の脂溶性ビタミン(White Dot; WD)の局在の変化を観察することができた。これは線維化肝臓における自家蛍光スペクトルイメージングの有効性を示している。

2. 肝炎組織自家蛍光スペクトル画像の定量解析法を開発

特徴的な分子構成と形態情報が内在する肝臓自家蛍光スペクトル画像の多元的な情報を定量解析するために、内部マーカーをスペクトルクラスタリング法に基づいて構成した。各内部マーカーはSHG、WD、RC、肝細胞(HP)に対応し、これらを領域分割法、数理形態解析に応用することで病態進行に伴う分子・形態情報の数値化手法を開発した。

まとめ

1050nmの近赤外多光子励起で肝細胞代謝亢進・肝星細胞が貯蔵する脂溶性ビタミン成分・肝障害に伴う炎症細胞を効果的に可視化できることが分かった。これは長波長励起が可能な多光子励起顕微鏡とスペクトル計測装置の組み合わせによってのみ実現可能な結果である。また、CCl₄誘発性肝線維症のマウス肝臓組織からのネイティブ蛍光のスペクトルイメージングにより、正常な状態と病気の状態だけでなく、進行性の病状も区別できることが分かった。このアプローチは、慢性肝疾患の分光法に基づくデジタル組織病理学の基礎を提供し、自家蛍光の変化に関連するさまざまな疾患に適用することができる。

多光子励起顕微鏡は、弱光毒性、高深部到達性などの条件から生体イメージングに広く応用されており、今後、多光子励起顕微鏡と計算手法を用いたリアルタイムのデジタル診断の実現が期待される。

文献

Tissue Intrinsic Fluorescence Spectra-Based Digital Pathology of Liver Fibrosis by Marker-Controlled Segmentation
 Saito et al
 Front Med (Lausanne). 2018 Dec 11;5:350. eCollection 2018
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00350/full>

製品情報

高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム AX R MP

高速画像取得の可能なレゾナントスキャナーにより、急速に変化する生体反応を、視野数22mmの広視野の周辺まで、2K×2K(2048×2048画素)の高解像度で捉えることが可能です。様々な情報を効率的に取得でき、生命現象の研究をサポートします。

