

C-RED 2 による NIR-II 領域での *in vivo* イメージング

C-RED 2は高感度 InGaAs カメラであり、 -40°C まで冷却して最適な性能を発揮するため、NIR-II 領域での蛍光画像撮影に最適なカメラです。前臨床試験の一環として、インドシアニングリーン (ICG) の生体内 (*in vivo*) 分布を画像で解析する実験をヌードマウスで行いました。高感度カメラによる、高画質でダイナミックなイメージングにより、生理的な状況下でのイメージングが可能になりました。

VO.0 09/07/2020

1. NIR-II 領域での *in vivo* イメージング

前臨床試験における動物モデルの *in vivo*での生体内イメージングは、生理的メカニズムの理解を深める上で重要な鍵を握っています。

過去数十年にわたり、この目的のために第1の生体窓 (NIR-I、700 ~ 900nm) での蛍光が広く利用されてきました。(ノ)

NIR-I 領域の蛍光は、吸収や散乱が少ないため、可視光よりも透過力が大きくなります (図1(A) 参照)。

しかし、この領域の波長では、数ミリメートルより深い信号は画像の分解能と感度が低下します。これは蛍光を励起する波長 (通常 700nm) の透過性が悪いことが一因です。(ク)

さらなる赤外領域、つまり第2の生体窓 (NIR-II、1100 ~ 1700nm) でのイメージングには、複数の利点があります^{[1]~[3]}。

- 1) NIR-II 蛍光体は、最適な透過性を持つ NIR-I 領域の波長で励起することができる (図1(B))
- 2) 第2の生体窓は散乱と吸収が少ない (図1(A))
- 3) 生体組織での蛍光が少ないため、シグナルバックグラウンド比を改善することができる

その結果 NIR-II では、可視光や NIR-I の蛍光と比較し、より優れた空間分解能、深い透過性、コントラストを実現します。前臨床試験^{[1][4]}や臨床試験^[5]において、重要な役割を果たすようになってきています。

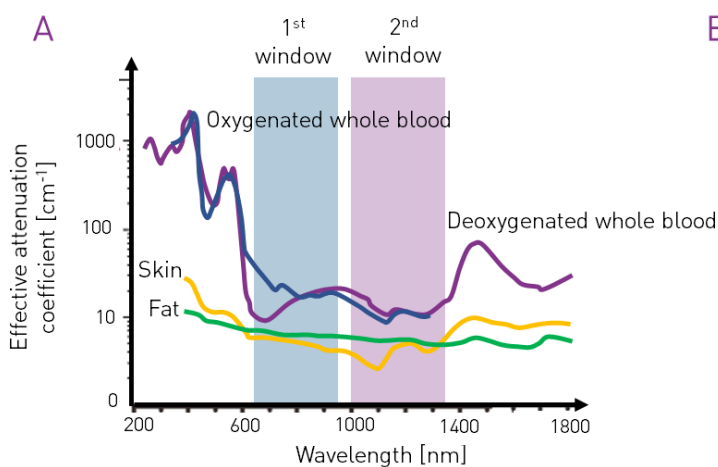


図1(A)：生体組織内において第1および第2の生体窓では、血液や組織からの吸収と散乱が少なくなるため、光がより容易に透過することができます。

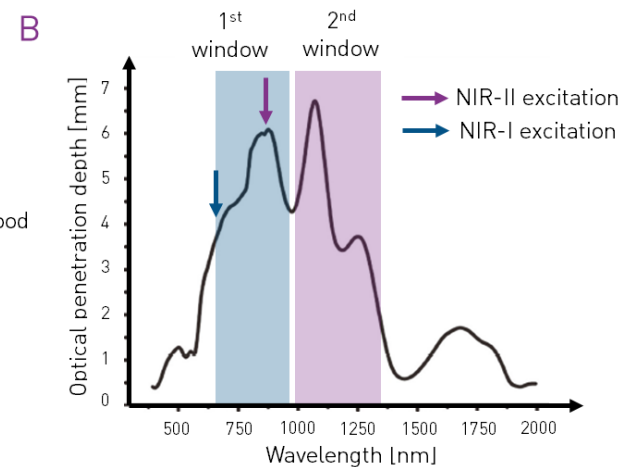


図1(B)：第1および第2の生体窓におけるイメージング時の透過スペクトル。矢印は一般的に励起に用いられる波長を表します。

NIR-I イメージングに使用される一部の造影剤は、NIR-II 領域においても発光する波長範囲があるので、これを利用できることが知られています (図2(B))。(ノ)

この造影剤は生体適合性があり、FDA 承認済みであるインドシアニングリーン (ICG) の場合であり、NIR-I と NIR-II の両方の蛍光イメージングに一般的に使用されているものです^{[6][7]}。

可視光およびNIR-Iイメージングに使用されるシリコンベースのカメラは、NIR-II領域では感度がありません(図2(A))。そのため、短波長赤外域(900~1700nm)に感度を持つInGaAsセンサーを用いた専用のカメラが必要となります。(ノ)

C-RED 2はFirst Light Imaging社が開発した640x512サイズのInGaAsカメラであり、NIR-II領域で高感度と高フレームレートを両立し、ダイナミックなイメージングを可能にしています。

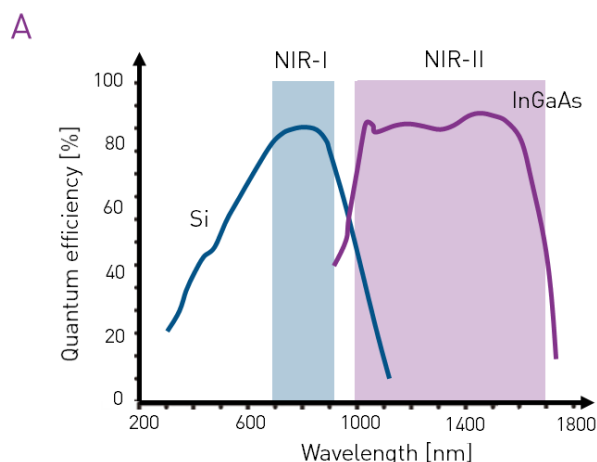


図2(A): シリコン(Si)とインジウムガリウムヒ素(InGaAs)センサーを用いた一般的なカメラの分光感度特性。InGaAsベースのセンサーは、第2の生体窓でのイメージングに最適です。

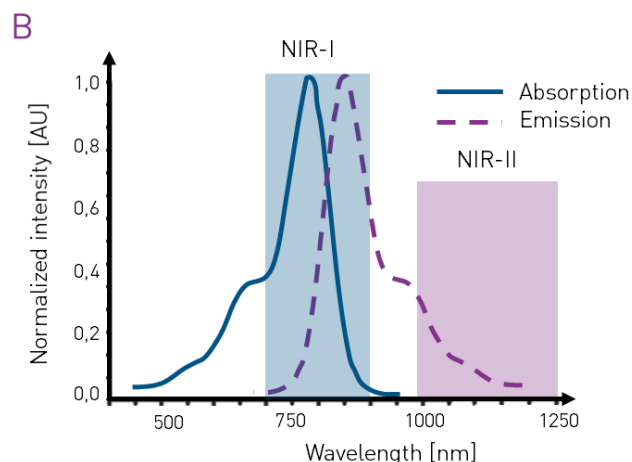


図2(B): インドシアニンググリーンの励起光と蛍光発光スペクトル。

<お客様へのメッセージ>

第2の生体窓(NIR-II、1100~1700nm)でのイメージングにより、より深い透過深度と高い空間分解能を実現します。

2. C-RED 2を使用したNIR-IIイメージング

前臨床試験用赤外線イメージャー

小動物のイメージング実験では、以下に紹介するシステムと殆ど同じ構成で実験を行っています。システムは、試料(マウス)を置くステージ、蛍光励起用のレーザー光源、対物レンズ、エミッションフィルターのセット、蛍光を検出するカメラなどのイメージングデバイスで構成されています。

図3に紹介する構成の例では、既存のSWIRイメージングデバイスにC-RED 2カメラを使用しています。励起光源には808nmで120mW/cm²のレーザー、エミッションフィルターはハイパスSWIRウィンドウのフィルターです。

OPTIMAL Grenoble社製の前臨床試験用イメージング装置でセットアップを行いました。

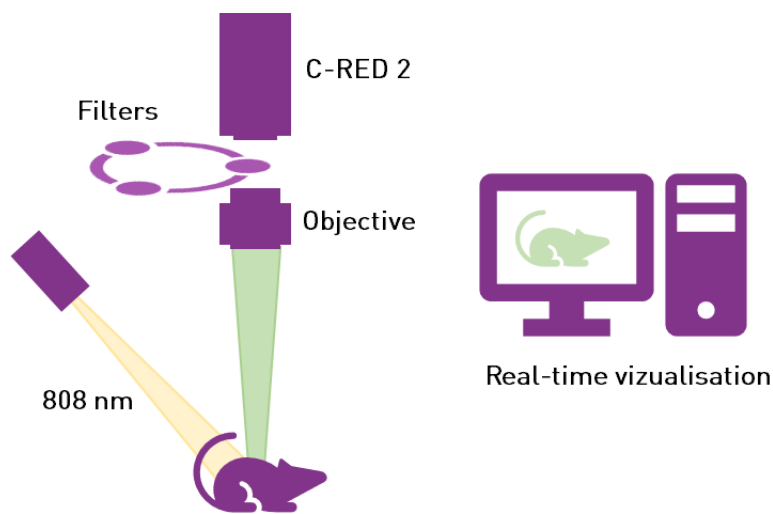


図3: 実験に使用した撮像システムの概略図

動物モデルおよび実験方法

6週齢の雌性ヌードマウス (Janvier Labs 社) に麻酔をして、500 μ mol/LのICG (Serb laboratory社) を尾部静脈内に注射。注射直後～40秒後までの動画と、注射後15分の間耳部の (ア)

結果

ICGを静脈内投与したマウスの全身を *in vivo* で NIR-II イメージングすることで、全臓器にわたる ICG の生体内分布を確認することができました。後肢の血管系、臓器、血管系、大腿血管を明瞭に確認することができます。他の生体組織の蛍光が少なく、(ア)

ズーム画像をタイムラプスで撮影し、耳部における ICG の生体内分布を記録しました。このリアルタイム *in vivo* イメージング実験は、OPTIMAL Grenoble 社によって実施されました。

コントラストの高い画像が得られていることにぜひご注目ください。図4は、主要な臓器の一部を示したものです。この画像は、露光時間10ms、100FPS、Highゲイン、CDSモードで撮影しました。コントラスト反転以外の画像処理は行っていません。

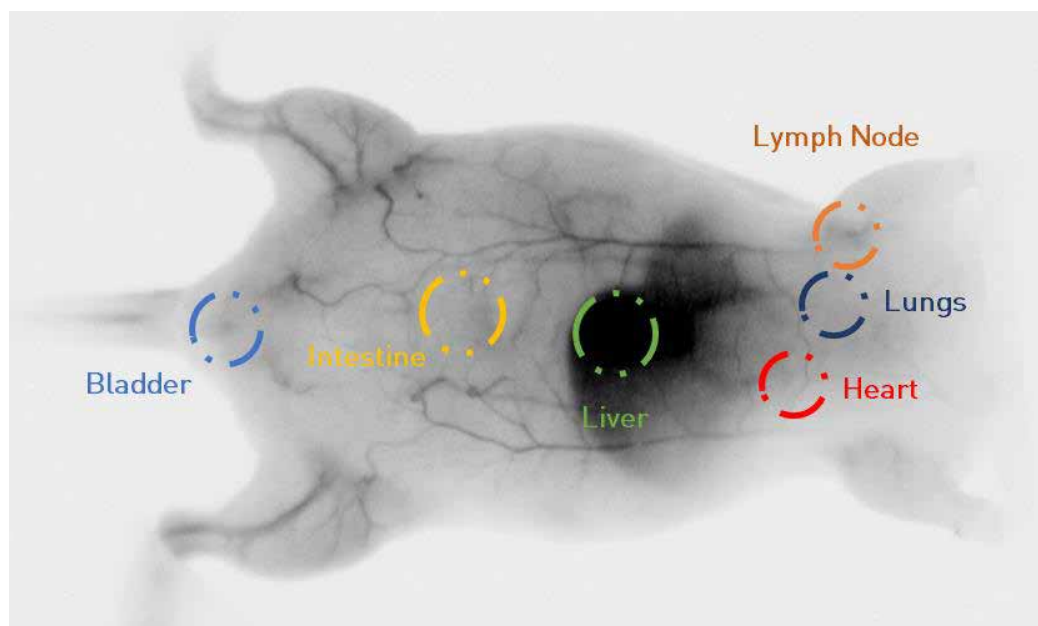


図4：
NIR-II 領域におけるマウス全身の
蛍光 *in vivo* イメージング。
血管網を高いコントラストで確認できます。
画像はコントラストを反転させ、
オートスケーリングしたものです。

マウス腹部の空間プロフィール (図5参照) では、このシステムのコントラストと解像度の高さを示しています。(ア)

プロフィールの横幅の狭さは血管部分の空間分解能の高さを、縦幅は蛍光部分と背景の比率を表しています。

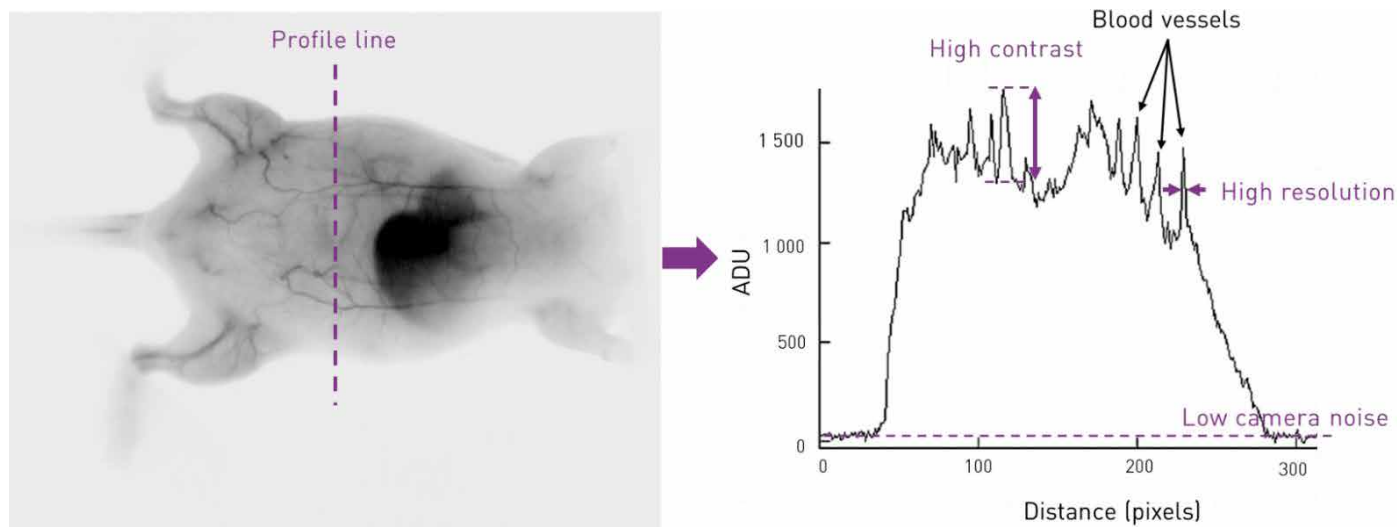


図5: NIR-II 領域のマウス全身の画像 (左) と、紫色破線部の蛍光強度のクロスセクションプロフィール (右)

図6は、耳の血管の例です。高倍率のレンズを使用することで、特定の部位をより詳細に観察することができます。撮影設定は露光時間500ms、2FPS、Highゲイン、CDSモードです。この画像もコントラスト反転以外の後処理や画像補正はしていません。(ノ)

高いシグナル/ノイズ比とシグナル/バックグラウンド比により、皮膚と皮下の血管まで可視化されていることにご注目ください。これにより、医薬品分野では特に、アレルギー物質による血管反応を非侵襲的に研究することが可能となります。

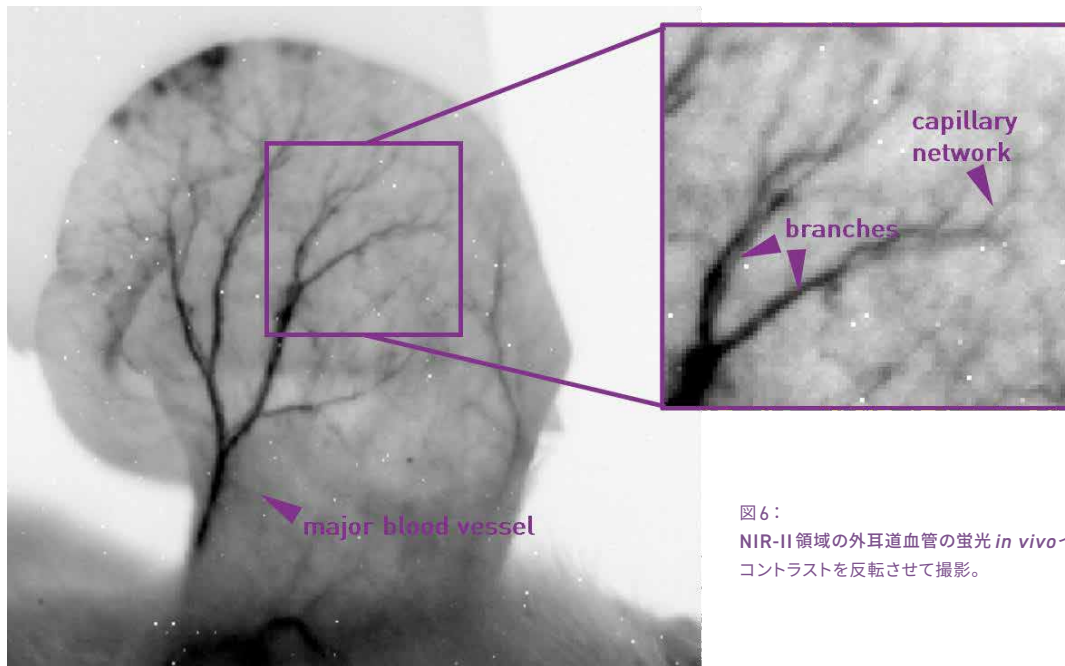


図6：
NIR-II領域の外耳道血管の蛍光 *in vivo* イメージング。
コントラストを反転させて撮影。

コントラストと解像度の両方を最適化するために、綿密に設計されたイメージングシステムです。

C-RED 2で設定可能なゲインとバイアスのオンザフライ補正により、高品質な画像をリアルタイムで可視化することができます。

これにより、蛍光マーカー (ICG) の生体内分布を正確に調べることができます。

3. *In vivo* ダイナミックイメージング

C-RED 2は高感度であることから、微弱な蛍光信号を短い露光時間で検出することが可能なため、高いFPSを実現できます。C-RED 2は、NIR-II領域においてInGaAs市場でも非常に高速なカメラであり、30electrons以下の読み出しノイズで、フルフレームモード時に最大600FPSで運用することが可能です。この結果、マウスの代謝をモニターするのに最適な時間分解能と高精度なダイナミックイメージングを実現しました。

First Light Vision GUIでは、8000フレーム以上の連続撮影が可能 (標準的な構成のPCの場合) で、.raw、.tiff、.avi (ノ)

など6種類のフォーマットで保存することができます。[Direct Record] オプションにより、その場で画像を保存し、さらに長い動画を取得することもできます。また、C-RED 2カメラはSDKが付属しており、MatLabやLabViewなどと連動させることも可能です。

ヌードマウスにICGを注射し、Highゲインモード、露光時間5ms (200FPS) で40秒間のムービーを撮影しました。動画は、First Light Imaging社のホームページでご覧いただけます。

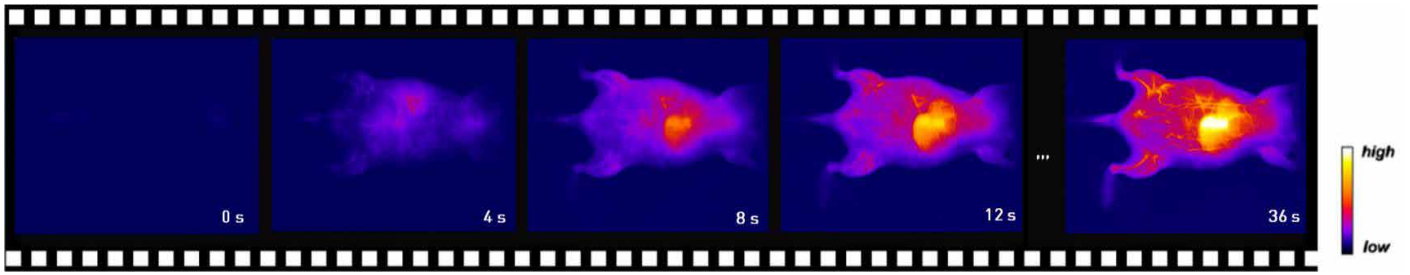


図7：マウス尾部にICGを静脈内投与した際の生体内分布のNIR-II蛍光イメージング。ICGの拡散を示す40秒間の動画からのスクリーンショット。カラーコード画像で、カラーバーは蛍光強度を示しています。

肝臓へのICGの蓄積、心臓や肺の収縮が明瞭に確認できます。また、マウス全身の血管に薬剤が拡散するにつれてコントラストが強くなる様子が観察できます。

1回目の注射から10分後に2回目のICGの静脈内注射を（ア）

行い、2回目のムービーをHighゲインモード、露光時間50ms（20FPS）で1分間撮影しました。

動画の詳細については、First Light Imaging社のホームページをご参照ください。

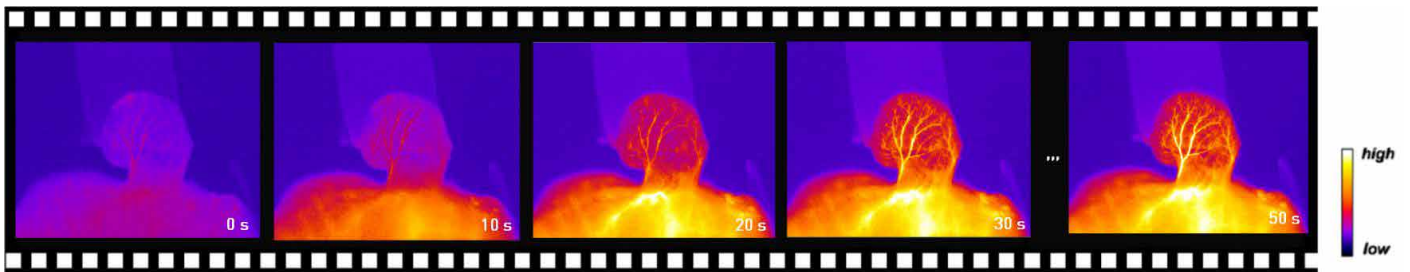


図8：耳介にICGを静脈内注射した後の生体内分布のNIR-II蛍光イメージング。ICGの拡散の様子を観察した1分間の動画のスクリーンショット。カラーコード画像で、カラーバーは蛍光強度を示しています。

ICGが血管内に拡散するにつれて、耳介部の微小血管が明瞭になる様子が観察できます。

C-RED 2カメラの高感度性能により、短い露光時間での撮影が可能になります。

このカメラは業界最速クラスのフレームレート（フルフレーム時600FPS）で撮影できるため、非常に高い時間分解能を実現します。

4. データの解析

C-RED 2の高感度と高フレームレートにより、高い時間分解能での蛍光信号撮影を実現しました。バイタルサイン（心拍数、（ア）

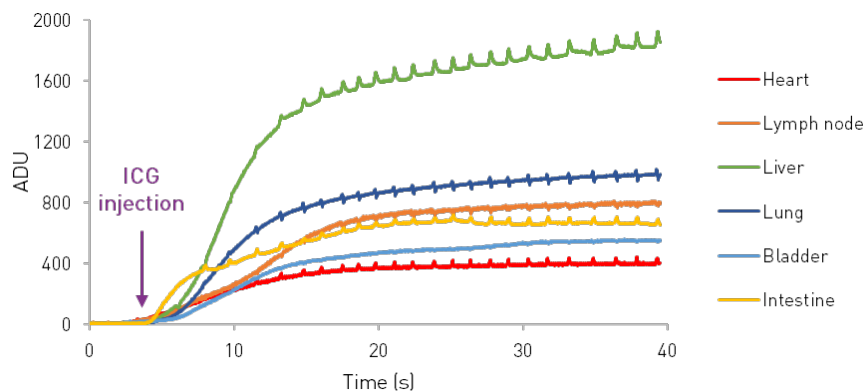
呼吸数）、造影剤蓄積量、代謝率などの生体パラメータを *in vivo* でリアルタイム・ダイナミックにモニタリングすることが可能です。

バイオダイナミクスの正確な評価

蛍光信号の時間的な変化は、特定の臓器における蛍光強度の時間的な変化として観察することができます（図9）。各臓器におけるICGの分布を時間的に追跡することができます。（ア）

図9ではICGが肝臓に蓄積していく様子が確認できます。このように非接触で非侵襲的であっても正確な評価や研究が可能になります。

図9:
生体内における
蛍光輝度の時間変化。
6つの撮影範囲(臓器)
における40秒間の推移。



非侵襲的かつ非接触のモニタリング

注射後1分経過後から80秒間、露光時間10ms(100FPS)でタイムラプス撮影しました。ここから心拍数や呼吸数などの生理学的パターンを測定することができます。測定にはタイムプロット(図10)またはフーリエ変換を使用します。(ア)

その結果、マウスの呼吸数(1.03回/秒)および心拍数(7.6回/秒)が計算できます。この値は、文献にある記載と一致しています。他の撮影範囲(臓器)の蛍光強度も呼吸速度と同期していることにご注目ください。

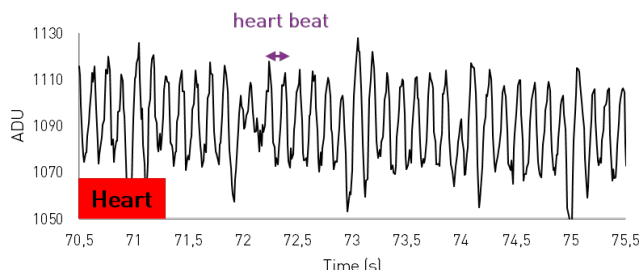
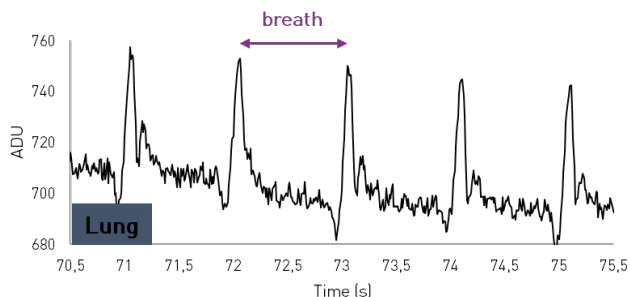


図10: 生理学的パラメータの時間変化。2つの撮影範囲(臓器)における5秒間の推移。横軸(時間)は注射後の秒数を表しています。

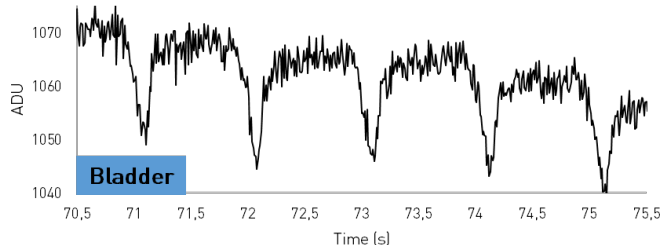
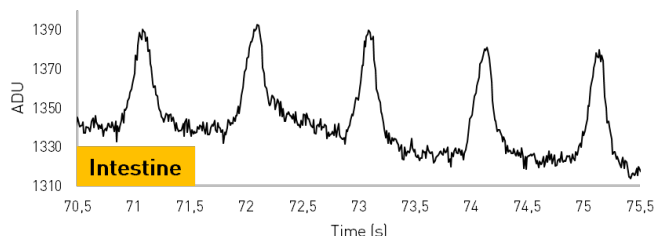
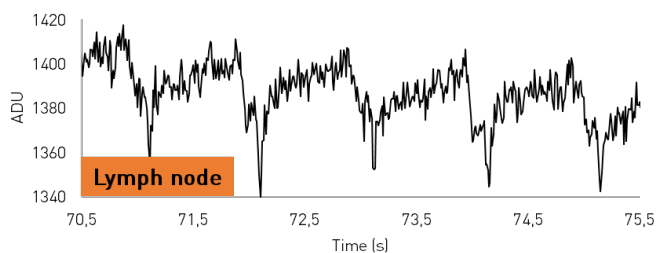
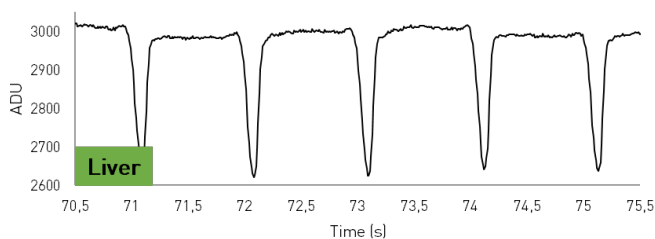


図11: 生理学的パラメータの時間モニタリング。4つの撮影範囲(臓器)における5秒間の時間プロファイル。横軸(時間)は注射後の秒数を表しています。

C-RED 2は、生体パラメータの時間経過による変化を正確に解析することが可能です。

5. 前臨床イメージングにC-RED 2を使用する理由

多くの理由から、C-RED 2は小動物のイメージングに理想的な選択肢と言えます。下記にそのいくつかをご紹介します。

- **簡単な組込：** カメラはシステムに簡単に組み込むことができるよう、底面、側面、前面に固定用のネジ穴が設けられており、光学インターフェースにはC/CSマウントを備えています。付属のFirst Light Vision GUIソフトウェアによりC-RED 2はプラグアンドプレイカメラとなり、また、汎用性の高いSDKも付属するため、MatLab、LabViewなどとの連携も可能です。
- **特殊ムービー機能：** PCのメモリを直接割り当てて画像バッファとすることで、長時間の動画撮影が可能です。また、[Direct Record]機能により、オンザフライで画像を保存し、PCの保存容量限度まで動画を撮影することが可能です。
- **高感度：** $30e^-$の低読み出しノイズと$600e^-/\text{pix}/\text{s}$に最適化された暗電流（-40℃時）により、C-RED 2は非常に高感度で撮影できるため、微弱な信号の検出を可能にします。
- **長時間露光に最適化：** 熱電冷却に空冷（ファン）、水冷の組み合わせるにことにより、-40℃まで冷却することができます。さらに長い露光時間での画像取得にも最適化されています（参照：[Focus On... Long Exposure Times with C-RED 2](#)）。
- **オンザフライで補正が可能：** バイアス補正やゲイン補正をリアルタイムに行うことができます。
- **実験の簡略化：** 複数の設定が必要な複雑な実験でも、最大10種類のプリセット設定をカメラに保存しておけば、素早く設定を切り替えることができます。

C-RED 2は、プラグアンドプレイのカメラです。

First light Imaging社のC-REDカメラシリーズは、お客様の特定のユースケースに合わせるために、ハードウェアによる画像の最適化が可能です。

6. 結論

生体内の微小血管をリアルタイムで可視化することで、循環器系（血管解剖学、血流など）や関連する病態の理解をより一層深めることができます。また、心拍数や呼吸数などの生理的なパラメータを、非侵襲的かつ高い時間精度でモニタリングすることも可能です。このように、バイオメディカルでのNIR-IIイメージングは、腫瘍の可視化、創薬など、様々な用途に活用されています。

今回ご紹介したC-RED 2による実験は、小動物のイメージングにおいてその特性を示すものです。皮膚を傷付けることなく透過させ、マウスの血管系を高コントラストでイメージング（ア

）することができました。さらに、高い時間分解能を持つ動画で、生物学的なダイナミクスを正確にマッピングできることが示されました。

C-RED 2は、要求難度の高い短波長赤外線アプリケーションのために設計された最新鋭のカメラです。汎用性が高く、長時間露光、超高速フレームレート（最大600FPS）、短時間露光のいずれにおいても高品質のセンシングを可能にします。このため、C-RED 2は非常に柔軟性が高く、小動物のイメージングに最適です。

7. 参考文献

- (1) Zhu, S.; Yung, B. C.; Chandra, S.; Niu, G.; Antaris, A. L.; Chen, X. Near-Infrared-II (NIR-II) Bioimaging via Off-Peak NIR-I Fluorescence Emission. *Theranostics* 2018, 8(15), 4141-4151. <https://doi.org/10.7150/thno.27995>.
- (2) Bhavane, R.; Starosolski, Z.; Stupin, I.; Ghaghada, K. B.; Annapragada, A. NIR-II Fluorescence Imaging Using Indocyanine Green Nanoparticles. *Sci. Rep.* 2018, 8(1), 14455. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32754-y>.
- (3) Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S. Second Window for in Vivo Imaging. *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4(11), 710-711. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.326>.
- (4) Byrd, B. K.; Marois, M.; Tichauer, K. M.; Wirth, D. J.; Hong, J.; Leonor, J. P.; Elliott, J. T.; Paulsen, K. D.; Davis, S. C. First Experience Imaging Short-Wave Infrared Fluorescence in a Large Animal: Indocyanine Green Angiography of a Pig Brain. *J. Biomed. Opt.* 2019, 24 (08), 1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.24.8.080501>.
- (5) Hu, Z.; Fang, C.; Li, B.; Zhang, Z.; Cao, C.; Cai, M.; Su, S.; Sun, X.; Shi, X.; Li, C.; Zhou, T.; Zhang, Y.; Chi, C.; He, P.; Xia, X.; Chen, Y.; Gambhir, S. S.; Cheng, Z.; Tian, J. First-in-Human Liver-Tumour Surgery Guided by Multispectral Fluorescence Imaging in the Visible and near-Infrared-I/II Windows. *Nat. Biomed. Eng.* 2020, 4 (3), 259-271. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0494-0>.
- (6) Starosolski, Z.; Bhavane, R.; Ghaghada, K. B.; Vasudevan, S. A.; Kaay, A.; Annapragada, A. Indocyanine Green Fluorescence in Second Near-Infrared (NIR-II) Window. *PLOS ONE* 2017, 12(11), e0187563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187563>.
- (7) Carr, J. A.; Franke, D.; Caram, J. R.; Perkinson, C. F.; Saif, M.; Askoxyllakis, V.; Datta, M.; Fukumura, D.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G.; Bruns, O.T. Shortwave Infrared Fluorescence Imaging with the Clinically Approved Near-Infrared Dye Indocyanine Green. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018, 115 (17), 4465-4470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718917115>.

本実験の動画をYouTubeでご覧いただけます。

Videos of Small animal imaging with C-RED 2 (YouTube):

[Small animal imaging in NIR II with C-RED 2, Part 1](#)

[Small animal imaging in NIR II with C-RED 2, Part 2](#)

詳細情報またはアプリケーションに関してのご質問などは、(株) オプトサイエンスまでお気軽にお問い合わせください。

First Light Imaging SAS
Europarc Sainte Victoire Bât 6, Route de Valbrillant, Le Canet 13590
Meyreuil FRANCE
Tel.: +33 4 42 61 29 20
www.first-light-imaging.com
contact@first-light.fr

First Light Imaging Corp.
185 Alewife Brook Parkway, Suite 210, Cambridge, MA 02138 USA
www.first-light.us

OPTO SCIENCE, INC.

株式会社オプトサイエンス

〒160-0014 東京都新宿区内藤町1番地 内藤ビルディング
Tel.: 03-3356-1064
www.optoscience.com
info@optoscience.com



記載内容および画像の転載、複製、加工などは禁止です。
また、記載内容は予告なく変更することがあります。ご了承ください。 Ver.1.0_2212