

Title	近赤外ラマン分光法による生体内ガス分子動態の可視化と腫瘍検出技術への応用
Sub Title	Visualization of gas molecules in vivo using infrared Raman Spectroscopy and application to tumor detection
Author	塚田, 孝祐(Tsukada, Kosuke)
Publisher	
Publication year	2013
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2012. )
JaLC DOI	
Abstract	腫瘍や炎症で増大するガス分子を顕微ラマン分光を利用して検出し、画像化する新しい技術開発を行うことを目的とした。 まず近赤外領域で高感度にラマン散乱光を取得する光学系を構築し、ナノ秒時間ゲートシステムを用いることでバックグラウンド蛍光の除去を実現した。培養細胞に応用し、腫瘍細胞の培地中グルコース濃度を定量した。今後、腫瘍低酸素による糖代謝と、ミトコンドリア呼吸を制御するガス分子との関連を明らかにするツールとして応用可能であると考えられた。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2012 課題番号：22700476 研究分野：総合領域 科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22700476seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22700476seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22700476

研究課題名（和文）近赤外ラマン分光法による生体内ガス分子動態の可視化と腫瘍検出技術への応用

研究課題名（英文）Visualization of gas molecules in vivo using infrared Raman Spectroscopy and application to tumor detection

研究代表者

塚田 孝祐 (Tsukada, Kosuke)

慶應義塾大学・理工学部・専任講師

研究者番号：00351883

研究成果の概要（和文）：腫瘍や炎症で増大するガス分子を顕微ラマン分光を利用して検出し、画像化する新しい技術開発を行うことを目的とした。まず近赤外領域で高感度にラマン散乱光を取得する光学系を構築し、ナノ秒時間ゲートシステムを用いることでバックグラウンド蛍光の除去を実現した。培養細胞に応用し、腫瘍細胞の培地中グルコース濃度を定量した。今後、腫瘍低酸素による糖代謝と、ミトコンドリア呼吸を制御するガス分子との関連を明らかにするツールとして応用可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We developed an optical system of time-resolved Raman spectroscopy to detect and image gaseous molecules which increase in tumor or inflammatory conditions. The system has a high sensitivity for detecting Raman scattering by reducing the fluorescence background with nanosecond time-gate system. We applied it cellular experiments, and measured glucose concentration in the culture medium. In future, our system can be applied to reveal relation between glucose metabolism under tumor hypoxia and gaseous distribution in mitochondria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：がん ラマン散乱 低酸素 生体医工学

## 1. 研究開始当初の背景

NO（一酸化窒素）やCO（一酸化炭素）といったガス状分子は、極小分子で生体組織内の透過性が高く、低濃度で大きな生理作用を有する。特に腫瘍や様々な病態における炎症反応によってガス分子は局所に濃度を高め、生体情報分子として機能し、血管反応や血管

構造、また腫瘍の転移に深く関与する。申請者らは最近、腫瘍内のNOを人為的に制御することで腫瘍内の未熟な微小血管の構造が正常化し、放射線効果が増大することを報告した。これはNOが腫瘍内の微小環境を制御する重要な分子であることを示している。

しかし、組織透過性が高く、時間的に増減

するガス状の生体情報分子を生きた組織においてリアルタイムで解析する技術は存在せず、国内外で更なる生理・病態メカニズムの理解が遅れる一因になっている。腫瘍内は極度に低酸素状態であり、転写因子 HIF-1 によって誘導される NO や CO が高濃度に発生しているが、これらのガス分子は細胞保護作用と毒性を併せ持つ諸刃の刃であり、腫瘍内における役割は十分に明確化されていない。NO に関しては蛍光プローブが開発されているが、原理上、NO が減少しても蛍光強度は減少しない蓄積型の蛍光プローブであり、時間的な NO の増減を評価することは不可能である。CO に関しては電極が開発されているものの、生体内の局所の分布を計測することは不可能であった。以上のように、生体内で情報分子として機能するガス状分子動態を定量的かつ経時的に計測するためには、従来にはない新しい技術開発を行う必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究はガス分子-ヘムタンパクの相互作用を解析可能なラマン分光法を用いて、腫瘍組織中のガス分子の挙動をリアルタイムで測定する技術を医学・工学の両側面からアプローチして定量解析する技術開発を行うことを目的とした。そのために生体内深部組織を計測可能にするために近赤外レーザを用い、また空間分解能を向上させて局所のガス分子動態を解析するために生体顕微鏡を中心とした光学系をセットアップする。これにより腫瘍だけでなく様々な病態におけるガス分子の機能と役割を細胞・組織レベルで評価することが可能になる。具体的な研究のプロセスとしては光学系の構築および評価、時間分解計測による感度向上の検討、細胞実験を行い、計測系の有効性を検討する。最終的には開発した技術を生体のガス分子イメージングに発展させ、さらに基礎医学分野における実験機器のレベルから病態の早期発見に向けた検出機器の基盤技術創成を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 近赤外顕微ラマン分光システム

ラマン分光法は、電子の振動回転準位に依存する散乱光のスペクトルから物質を同定する手法であり、特定分子の同定に適している。生体試料への効果的な測定を考慮し、組織透過性の高い近赤外の波長 785 nm の半導体レーザを用いた。連続光のレーザ (wavelength: 785 nm, power: 80 mW) は音響光学変調器 (AOM) によってパルス化した。このレーザパルスは顕微鏡の中を通り、レーザーラインフィルター、ダイクロイックミラーを介してサンプルへと照射される。サンプルから発せられたラマン散乱光は再び顕微鏡

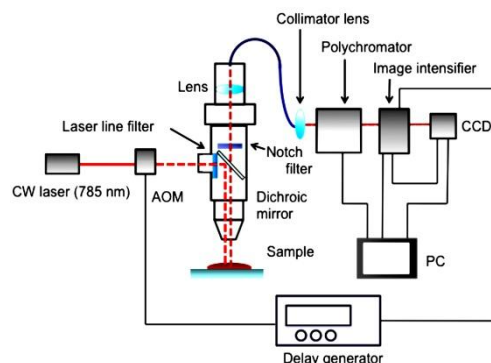


図 1 近赤外高速ゲートラマン分光装置略図

の中を通りノッチフィルター、レンズを介して光ファイバーへと入射される。ポリクロメーターで分光し、イメージンシファイアで増強をして CCD で検出を行った。図 1 にセットアップした光学系を示した。

生体試料には少なからず蛍光を発する分子が存在する。一方、ラマン散乱光強度は蛍光の発光強度に比べると非常に微弱である。そこで時間分解ラマン分光を用いることにより蛍光除去を検討した。パルスレーザと時間ゲートの同期をとることで蛍光のみを除去する手法を用いた。時間ゲートはイメージンシファイアに搭載されたゲート機能を用いた。ラマン散乱光はレーザパルスの照射している間でのみ検出されるのに対し、蛍光は数 ns から数十 ns 程度発光する。そこでパルスレーザで照射した直後にゲートが off になるように同期をとることで、蛍光を除去しラマン散乱光のみの検出が可能になった (図 2)。ここでレーザの照射時からゲートが off になるまでの時間を検出時間とした。ディレイジェネレーターによってイメージンシファイアと AOM の動作タイミングを調整する事により検出時間の制御が出来るため、時間分解による計測を可能にした。

### (2) サンプル調整と計測

ラマン散乱光を効率良く発する 4'-nitro-4-dimethylaminoazobenzene(DANA) に蛍光色素である粉末の rhodamine6G を 1:1 の割合で混合した。レーザパルス幅は 200  $\mu$ s, イメージンシファイアのゲインは 45, 積算回数は 1000 回, 検出時間は 30 ns から

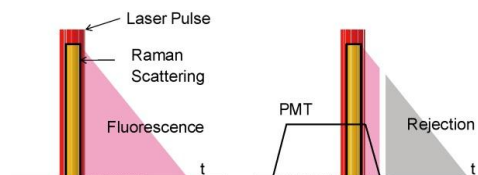


図 2 時間分解蛍光除去法

500  $\mu\text{s}$  としてラマンスペクトルを取得した。細胞試料としてマウス肺がん細胞株である Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を用いた。蛍光除去効果の実験では Rhodamine 6G を用いて LLC のミトコンドリアを染色した (図 3)。Rhodamine 染色細胞からはラマン散乱光に対し、自家蛍光および Rhodamine の蛍光がノイズ成分として加えられることになる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 時間ゲートラマンによる蛍光除去

サブナノ秒レベルの時間分解ゲートシステムを用いて検出時間を変化させ、ラマン散乱信号の S/N を検討した。検出時間が 200  $\mu\text{s}$  より短くなったところで 1100  $\text{cm}^{-1}$  に見られる DANA のラマンピークよりも蛍光強度が下がっていくのが確認出来た (図 4)。このことから時間分解により蛍光が有効に除去された事が示唆された。検出時間が 30 ns の時にはラマンピークが鋭く現れているが、同時にノイズも大きくなり、これは検出時間を短くした事によりレーザーパルスそのものを時間的に削っている可能性が考えられた。これを改善するためには、レーザーそのものの強度を上げるかパルスの立ち上がり時間を速くする必要があるが、高出力のレーザーを使用した

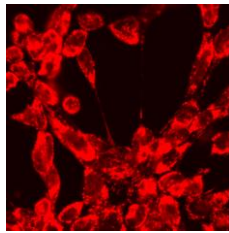


図 3 Rhodamine 標識されたマウス肺がん細胞

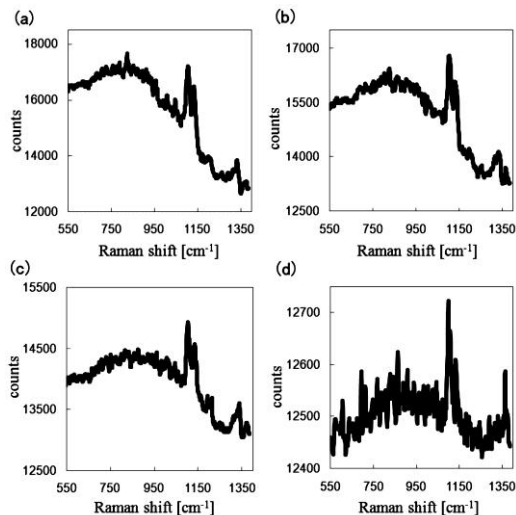


図 4 蛍光除去による S/N の改善: 検出時間はそれぞれ(a) 350  $\mu\text{s}$  (b) 200  $\mu\text{s}$  (c) 100  $\mu\text{s}$  (d) 30 ns

場合には試料の損傷の恐れがあるため十分注意しなければならない。LLC を用いた実験でも同様に蛍光染色された Rhodamine が有効に除去され、細胞膜脂質を示す 3000  $\text{cm}^{-1}$  の信号が蛍光除去により観察され、生体試料にも応用可能であることが示された。

##### (2) 腫瘍の糖代謝計測への応用

生体実験に先駆け、細胞内でエネルギー産生のリソースとなるグルコース単体のラマン散乱スペクトルを実計測した。図 5 は  $^{12}\text{C}$ -glucose および安定同位体の  $^{13}\text{C}$ -glucose のラマンスペクトルである。分子量の違いにより、ピークを示す波数に違いが認められた。今後は細胞培養液の組成分子を混合させ、グルコース濃度変化を計測する実験、細胞培養条件下で乳酸など解糖系代謝産物の計測などを実施し、糖代謝速度を定量する実験に発展させる。本法の確立により、従来は培養液や組織をサンプリングして分析するポイント計測に限定されていた糖代謝を非接触連続計測することが可能になる。さらに将来的には開発した技術を糖尿病患者の在宅血糖モニタリング装置の開発に応用することも考えられ、現在在宅で行われている微量採血による血糖測定より遙かに低侵襲な血糖モニタリングが可能になると考えている。

本研究では微弱なラマン散乱信号を高効率で検出するために蛍光除去のナノ秒時間ゲートシステムを構築し、その有効性を示した。低酸素環境における代謝の変化、またそれによる組織内ガス分布の動態を定量するには至らなかった。しかし既に申請者らは光学的に組織酸素分圧を計測する計測系を確立しており、低酸素の二次元イメージング、さらに本課題で進めた近赤外時間分解ラマン計測系を組み合わせることにより、腫瘍の低酸素・代謝メカニズム解明に向けた実験を進めている。また、本テーマは医学・生物学と工学の異分野融合型研究であり、その実現は基礎医学から医療応用へのプロセスに医用工学が重要な役割を演ずる研究として特徴的であると考えている。今後、医学と工学の融合が一層加速することを期待している。

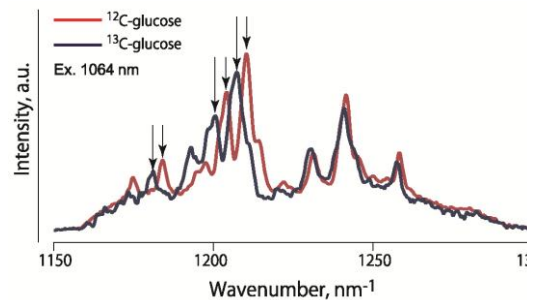


図 5 安定同位体グルコースのラマンスペクトル

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Tsukada K. and Suematsu M., Visualization and analysis of blood flow and oxygen consumption in hepatic microcirculation: application to an acute hepatitis model, *Journal of Visualized Experiments*, 査読有, 66, e3996. doi: 10.3791/3996, 2012.
2. Shiwa T., Uchida H. and Tsukada K., Co-culture microdevice with oxygen gradient for tumor microenvironment model and metastasis imaging, *Am. J. Biomed. Eng.*, 査読有, 2(4), 175-180, 2012.
3. 山田 遼, 堀之内宏久, 塚田孝祐: 腫瘍の低酸素イメージングと酸素化過程における時空間解析, *電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌)*, 査読有, 132(10), 1602-7, 2012.
4. Yamada R., Horinouchi H., Tsukada K., Spatiotemporal measurement of tumor oxygenation reveals repeat hypoxic phenomenon in mice, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011, , 査読有, 5965-5968, 2011.

[学会発表] (計 9 件)

1. Osaki H., Tamano Y. and Tsukada K., Fluorescence reduction in time-resolved Raman spectroscopy for the detection of circulating tumor cells, 2012 Annual Meeting of BMES, 2012.10.27 (Atlanta, USA).
2. Yoshida R., Yanagisawa Y. and Tsukada K., Development of a phosphorescence-based oxygen sensor using organic electroluminescence, 2012 Annual Meeting of BMES, 2012.10.27, (Atlanta, USA).
3. Uchida H., Shiwa T., Sato A. and Tsukada K., Development of a microfluidic device forming oxygen gradient for cell culture, 2012 Annual Meeting of BMES, 2012.10.25, (Atlanta, USA).

4. 山田 遼, 塚田孝祐, ガルバノスキャナを用いた生体組織高速酸素マッピング手法の提案と評価, 生体医工学シンポジウム 2012, 2012.9.7. (大阪).

5. 塚田孝祐, 生体の顕微的血流・低酸素イメージングと腫瘍生物学への応用, 2011 年度大阪電気通信大学情報施設研究会, 2012.3.12 (大阪)
6. 塚田孝祐, 生体分光計測が解き明かすがんの低酸素・糖代謝メカニズム, 日本学術会議 第二回先端フォトニクスシンポジウム, 2011.10.7 (東京)
7. Yamada R., Horinouchi H., Tsukada K., Spatiotemporal measurement of tumor oxygenation reveals repeat hypoxic phenomenon in mice., 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2011.9.2 (Boston, USA).
8. 塚田孝祐, 顕微的酸素代謝の定量と腫瘍モデルへの応用, 第 3 回細胞機能可視化研究会, 2010.9.21. (東京)
9. 塚田孝祐, 組織血流と低酸素の光計測技術: 実用化と医療展開に向けて, 次世代医療システム産業化フォーラム 2010, 2010.9.9 (神戸)

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚田 孝祐 (TSUKADA, KOSUKE)  
慶應義塾大学・理工学部・専任講師  
研究者番号: 00351883

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: