

機関番号：240303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20500396

研究課題名 (和文) ラマン光を用いた細胞内薬物代謝の可視化

研究課題名 (英文) Intracellular Dynamics of a drug by Raman microscopy

研究代表者

原田 義規 (HARADA YOSHINORI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10381956

研究成果の概要 (和文)：

ラマン散乱光は無染色で細胞内分子の局在を観察するために有用と考えられるが、ラマン散乱光は微弱なため非常に長い計測時間を要し、生細胞の観察にはあまり適していなかった。本研究では、高速ラマン顕微鏡を用いて、生細胞と抗癌剤の細胞内分布・代謝イメージングを試みた。共鳴ラマン散乱を用いることにより生細胞イメージングが短時間で可能となった。抗癌剤 CPT-11/SN-38 の細胞内局在の非染色イメージングが可能であった。また、抗癌剤の細胞内代謝についても解析を行った。ラマン散乱スペクトルの持つ分子情報をもとにイメージングを行えばプローブを用いなくとも細胞内薬物分布が可視化でき、非染色・非破壊・多次元な解析が可能と考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Since Raman scattering light measurement does not require pretreatment, biochemical molecules in their innate state can be analyzed where no exogenous probes are added. However, imaging analyses of biological events in living samples by using Raman scattering light measurement have been relatively unsuccessful because of low Raman scattering efficiency and the required long measurement time. In this study, we attempted to visualize drug distribution in living cancer cells treated with an anticancer reagent CPT-11 by using high-speed Raman microscopy. We also analyzed intracellular conversion of CPT-11 to its metabolite SN-38 using Raman spectra.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：バイオイメージング、ラマン分光、薬物代謝、細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、薬物の細胞内代謝を *in situ imaging* する手法は有力なものはない。薬物を蛍光分

子などのプローブで標識すると、プローブが細胞内薬物代謝に影響する可能性がある。Positron Emission Tomography等、放射線を用いたイメージングは、その解像度はサブミリオオーダーまでであり、細胞内代謝をみることはできない。一方、ラマン散乱光は、分子同定および分子構造の解析に非常に有効な方法であり、材料工学、構造化学等の分野における分子同定に必須の技術として用いられてきた。しかし、医生物学分野ではあまり用いられていない。これは、ラマン散乱の散乱効率が低く、測定に時間がかかり、常に変化する生体組織や細胞の観察に適していないことが原因であった。

しかし、最近、生細胞の観察に利用可能な高速共焦点ラマン散乱顕微鏡が開発された(Proc. SPIE 2007)。その撮像速度は従来技術に比べて約100倍である。一方、組織レベルでラマン散乱光により薬剤局在および代謝をマッピングする試みが、最近報告されたが(J Invest Dermatol(2007)127:1205)、その低い解像度(細胞形態の認識不可能)と長い撮像時間(約10時間弱)のため、細胞および細胞内小器官における薬剤局在および代謝を解析することは不可能であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高速共焦点ラマン顕微鏡を用いて、非染色かつ細胞が生きたまま、薬剤、特に抗癌剤の細胞内局在および代謝を、分子イメージングする手法を確立することである。ラマン散乱光は非常に微弱なため、ラマン散乱光による分子イメージングを行うには莫大な時間がかかり、生細胞をありのままに観察することは従来不可能であった。今回、我々はラマン散乱顕微鏡を用いて、生細胞イメージングおよび抗癌剤の細胞内分布および細胞内代謝をイメージングする手法を開発することにした。

3. 研究の方法

ラマン散乱光は非常に微弱なため、細胞内薬物のラマンスペクトルを高感度、高選択的に分子イメージングする必要がある。

(1) 高速共焦点レーザー走査顕微鏡の調整

生細胞イメージングに最適化させるべく、光学系の調整を行った。顕微鏡の基本構成は高速共焦点スキャナーを使用した共焦点顕微鏡である。ラマン散乱能は蛍光顕微鏡より14桁、赤外顕微鏡より10桁低く、通常の光源と検出器では信号を得ることが困難なため、光源には高出力型レーザーを用いている。サーボガルバノミラーによるライン照明を

用いて観察面内方向(x-y方向)の高速走査を行い、電子冷却型CCDカメラにより共焦点画像を得る。また、ラマン散乱光の励起光波長からのスペクトルシフト量は極めてわずかなため、高いスペクトル分解能を持つツェルニターナ型分光器を用いている。

(2) ライブセルイメージングに適した顕微鏡用還流型細胞培養装置の組み立て

倒立型顕微鏡ステージ上で長時間培養細胞を観察するため、温度・湿度・CO₂を管理しリアルタイムの生細胞観察を可能にする倒立顕微鏡用還流型チャンバーを組み立て、評価を行った。

(3) 高速共焦点レーザーラマン顕微鏡を利用した生細胞イメージングおよび細胞内抗癌剤局在および代謝の可視化

抗癌剤CPT-11処理後、ヒト癌細胞株の細胞内薬剤分布の観察を行い、顕微鏡システムの評価も同時に行い、高速液体クロマトグラフィーの結果と比較した。抗癌剤処理を行っていない生細胞のイメージングも合わせて行った。

(4) 薬物分析のためのスペクトル解析

共焦点ラマン顕微鏡で得られる5次元(空間三次元+時間+分子振動数)データの解析を行った。

4. 研究成果

新たに光学系を調整した高速共焦点レーザーラマン顕微鏡を用いることにより、細胞を生きたままイメージングすることが可能であった。特に、共鳴ラマン散乱効果を利用することにより、短時間で高解像イメージを得ることができた。また、生細胞を抗癌剤CPT-11/SN-38で処理後、その細胞内分布を非染色でイメージングすることも可能であった。CPT-11は細胞内カルボキシエステルゼにより活性体SN-38に代謝されることが知られているが、CPT-11からSN-38への細胞内代謝をラマンスペクトルにより*in situ*で捉えることが可能であった。ただし、細胞全体における薬物代謝イメージングはなお困難で、観察条件の一層の検討が必要と考えられた。ラマン顕微鏡の薬剤検出感度は高速液体クロマトグラフィーと比較し低いものの、*in situ*で細胞内薬剤分布を知ることができ、無染色・非破壊・多次元な細胞分子イメージングとして今後応用が広がると考えられた。これらの成果を、学術雑誌*Histochem Cell Biol*や第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会などで発表した。

またこれらの知見に基づいて、学術雑誌*Curr Pharm Biotechnol*のGuest editorとして、"Biomedical applications of molecular vibrational imaging"という特集号を企画し

た。本特集号では、ラマン散乱や赤外光の吸収を用いる振動分光法の生体機能解析への応用の現状と今後の展望について紹介し、我々は、生体ラマンイメージングに関する総説執筆を行った (Harada Y, Takamatsu T. Editorial: Biomedical applications of molecular vibrational imaging. *Curr Pharm Biotechnol. in press.*) (Harada Y, Takamatsu T. "Raman molecular imaging of cells and tissues: towards functional diagnostic imaging without labeling." *Curr Pharm Biotechnol. in press*)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- (1) Harada Y, Takamatsu T. Editorial: Biomedical applications of molecular vibrational imaging. *Curr Pharm Biotechnol. in press.*
- (2) Harada Y, Takamatsu T. Raman molecular imaging of cells and tissues: towards functional diagnostic imaging without labeling. *Curr Pharm Biotechnol. in press.*
- (3) Nakano K, Harada Y, Yamaoka Y, Miyawaki K, Imaizumi K, Takaoka H, Nakaoka M, Wakabayashi N, Yoshikawa T, Takamatsu T. Precise analysis of the autofluorescence characteristics of rat colon under UVA and violet light excitation. *Curr Pharm Biotechnol. in press.*
- (4) Inoue K, Wakabayashi N, Morimoto Y, Miyawaki K, Kashiwa A, Yoshida N, Nakano K, Takada H, Harada Y, Yagi N, Naito Y, Takamatsu T, Yoshikawa T. Evaluation of autofluorescence colonoscopy for diagnosis of superficial colorectal neoplastic lesions. *Int J Colorectal Dis* 25, 2010, 811-816.
- (5) Harada Y, Dai P, Yamaoka Y, Ogawa M, Tanaka H, Nosaka K, Akaji K, Takamatsu T. Intracellular Dynamics of topoisomerase 1 inhibitor, CPT-11, by slit-scanning confocal Raman microscopy. *Histochem Cell Biol.* 132, 2009, 39-46.
- (6) Murayama Y, Harada Y, Imaizumi K, Dai P, Nakano K, Okamoto K, Otsuji E, Takamatsu T. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by

using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 125, 2009, 2256-2263

(7) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. *Biochem Biophys Res Commun.* 382, 2009, 370-374.

(8) Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K, Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res.* 315, 2009, 1190-1199.

(9) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Takamatsu T. Tissue imaging of myocardial infarct regions by a slit-scanning Raman microscope. *Proc. SPIE.* 2009; 7169: 71690H.

(10) Harada Y, Furuta H, Murayama Y, Dai P, Fujikawa Y, Urano Y, Nagano T, Morishita K, Hasegawa A, Takamatsu T. Detection of disseminated peritoneal tumors by fluorescein diacrylate in mice. *Proc. SPIE.* 2009; 7190; 719019

[学会発表] (計 10 件)

- (1) Taniguchi D, Dai P, Harada Y, Yamaoka Y, Hojo T, Takamatsu T. Low-Energy Laser Irradiation Promotes Synovial Fibroblast Proliferation. Bios 2011-Part of SPIE Photonics West. 2011年1月25日 San Francisco, USA
- (2) Harada Y, Ogawa M, Yamaoka Y, Yaku H, Takamatsu T. High-Resolution Raman Tissue Imaging of Rat Myocardial Infarction. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. 2009年9月7-12日 Munich, Germany
- (3) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Takamatsu T. Tissue imaging of myocardial infarct regions by a slit-scanning Raman microscope. Bios 2009-Part of SPIE Photonics West 2009年1月24日-29日 San Jose, USA
- (4) 原田義規、高松哲郎

光を利用した無標識生体組織イメージング
第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会
2010 年 9 月 4 日 東京

(5) 原田義規、戴 平、山岡禎久、小川 貢、
高松哲郎
細胞内薬剤動態の振動分光イメージング
第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会
2009 年 9 月 26 日 大津市

(6) 原田義規、谷口大吾、戴 平、
北條達也、山岡 禎久、高松 哲郎
低出力レベルレーザーによる細胞増殖機序
の検討
レーザー顕微鏡研究会第 3 5 回講演会
2009 年 7 月 14 日 和光市

(7) 原田義規、小川貢、高松哲郎。
ラマン散乱顕微鏡による生体組織診断。
第 48 回日本生体医工学会オーガナイズドセ
ッション 2009 年 4 月 25 日 東京

(8) 原田義規、村山康利、戴 平、今泉克一、
中野圭明、岡本和真、大辻英吾、高松哲郎
大腸癌リンパ節転移モデルを用いた
5-aminolevulinic acid (5-ALA) のリンパ節
転移診断能の検討
第 48 回日本生体医工学会
2009 年 4 月 25 日 東京

(9) 小川 貢、原田義規、山岡禎久、
藤田克昌、高松哲郎
ラマン散乱を用いた生体組織診断
第 6 回医用分光学研究会
2009 年 2 月 6 日 川崎

(10) 原田義規、高松哲郎
化学工学に期待すること
第 17 回バイオイメージング学会 シンポジ
ウムⅣ
2008 年 10 月 30 日～11 月 1 日 千葉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 義規 (HARADA YOSHINORI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：10381956

(2) 研究分担者

山岡 05 禎久 (YAMAOKA YOSHIHISA)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：80405274