

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20860052

研究課題名（和文） 移植細胞の非侵襲定量評価のための積分球光学系を用いた赤外分光解析手法の開発

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF THE INFRARED SPECTROSCOPIC METHOD USING INTEGRATING SPHERE OPTICS FOR THE NONINVASIVE QUANTITATIVE EVALUATION OF IMPLANTED CELLS

研究代表者

石井 克典 (ISHII KATSUNORI)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：20512073

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は細胞の赤外波長域の光学特性を測定可能なシステム開発である。中赤外波長域用の双積分球光学系を備えた赤外分光システムおよび、試料厚みを正確に設定可能なサンプルホルダーの開発を行った。開発したシステムを使用し、マウス骨髄由来間葉系幹細胞株 Kusa-A1 の総透過率スペクトルを得ることに成功した。本研究開発技術により幹細胞の分化などの有用な情報を分光学的に正確に得ることが可能となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Objective of this study is the development of a system can which can measure the optical properties of cells in an infrared wavelength range. In this study, we developed the infrared spectroscopic system with double integrating spheres optics for mid-infrared wavelength region and the sample holder which can determine an accurate thickness of the sample. By using the developed system, the all transmittance spectrum of a mesenchymal stem cell line derived from mouse bone marrow, Kusa-A1, was measured. This technique may achieve to get effective spectroscopic information about cell differentiation and so on, quantitatively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,330,000	399,000	1,729,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,530,000	759,000	3,289,000

研究分野：生体光学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎／応用光学・量子光工学

キーワード：赤外分光、分子振動、積分球、非侵襲評価、移植細胞、再生医療

1. 研究開始当初の背景

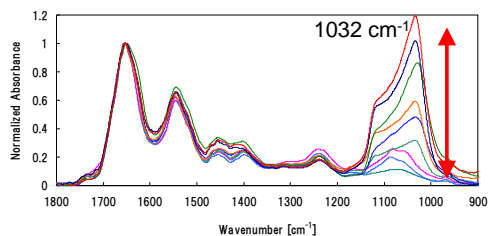
再生医療が次世代の有望な治療法として注目を集めており、日本の国家戦略として重点的に研究開発を行うターゲットの1つにもなっている。再生医療の実用化においては、

細胞・スキャホールド・これらの複合材料などの安全性を保證することが重要視されており、これらの有効性、妥当性、安全性の確認や評価方法の確立が、早期の実用化を図る上で極めて重要である。光分析の非侵襲性は、

抗体標識を利用しない評価手法としての特性を併せ持ち、移植前の細胞および細胞材料の品質分析技術及び再生治療による組織再生過程の術後診断技術において、その力を発揮できる可能性がある。

赤外分光分析は、分子振動由来の情報から生体分子を同定することができることから、細胞や組織の特徴的な分子に関する振動や発色団に関する波長の情報を得ることで、抗体標識を利用しない非侵襲的な分析手法として有用である。我々は、赤外分光分析を再生医療に利用される細胞、スキャホールドなどの生体材料の評価手法に適応するため、生体材料に化学修飾した官能基（リン酸基等）、組織前駆細胞の分化（脂肪分化等）、間葉系幹細胞の分化（骨芽細胞分化等）など、赤外分光を用いて低侵襲に、かつ従来法との相関を利用して定量的に解析する手法について研究を進めている。図1に間葉系幹細胞の骨芽細胞分化における赤外吸収スペクトル変化、図2に骨芽細胞分化に特徴的な波数 1032 cm^{-1} （リン酸カルシウムのリン酸基 P-O 結合由来）の赤外吸収ピーク変化及び従来法との相関を示す。これらの研究より、分化により変化する幹細胞を赤外吸収スペクトル解析することにより、細胞の分化の程度（細胞の移植時期）を評価・最適化できることを確認した。

(a)



(b)

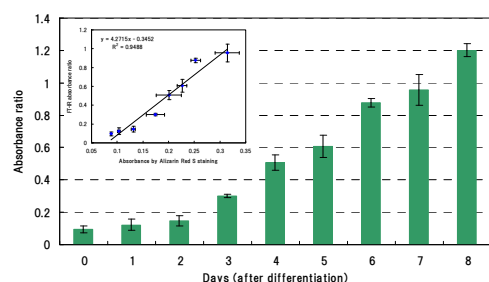


図1 (a) 間葉系幹細胞の骨芽細胞分化における赤外吸収スペクトル変化、(b) 1032 cm^{-1} の赤外吸収ピーク変化及び従来法との相関

すなわち、赤外分光分析により幹細胞の分化を評価可能である可能性がある。また、光学定数（物理定数）の導入により定量的な評価をすることにより、より詳細な情報が得られると考えた。

2. 研究の目的

生体組織の光学定数の研究は、可視・近赤外波長域では多くの先行研究が存在するが、中赤外波長域の光学定数算出は未踏の領域である。実際、対象が生体組織以外であっても、中赤外域の光学定数算出に関する研究は非常に少ない。また、対象が細胞の研究も報告例はほとんどない。つまり、中赤外波長域の正確な透過率(T)と反射率(R)の測定システムの確立から、TとRを用いて中赤外波長域の μ_a と μ_s が算出できるか、その物理計算手法まで研究の余地がある。さらに、対象が再生医療に用いる細胞の場合は、細胞試料を低侵襲に分析可能なサンプルホルダーの開発も求められる。

そこで研究では、中赤外波長域の正確な光学定数を算出するための要素技術として、TおよびRが測定可能な積分球光学系を開発することを目的とし、積分球光学系を開発および細胞試料の測定を行った。本研究により試作される積分球光学系を用いた分析により、細胞・組織の吸収係数を（将来的には散乱係数も）決定できると期待される。細胞の移植最適時期などを非侵襲かつ定量的に評価可能な新たな知見を得ることができる。

3. 研究の方法

積分球光学系を開発を行った。中赤外波長域を拡散反射可能な反射面を持つ金コート積分球（カスタムメイド3インチインフラゴールド積分球, Labsphere Inc., USA）を2つ使用し、双積分球光学系を構築した。反射球の入射側および出射側のポート直径はそれぞれ5 mmおよび10 mm、透過球の入射側のポート直径は10 mmとした。フーリエ変換型赤外分光光度計（Magna 550, Thermo Fisher Scientific Inc., USA）の光源、光学系、マイケルソン干渉計を利用し、双積分球光学系を備えた赤外分光システムを構築した。検出器には液体窒素冷却型MCT検出器

（MCT-13-4.0, InfraRed Associates Inc., USA）を使用した。図2に開発した双積分球光学系を示す。

また、生体試料の赤外分光分析では試料の厚みを非常に薄く（ μm オーダー）しなければならない。また、正確な吸収係数の算出には正確な厚み（光の通過する距離）が必要である。そこで、試料厚みを正確に設定可能なサンプルホルダーの開発を行った。窓材に厚さ1 mmの BaF_2 を用い、厚み調整幅が $\sim 13\text{ mm}$



図2 開発した双積分球光学系



図3 試料厚み可変サンプルホルダー

で $0.5\ \mu\text{m}$ 単位で可変制御可能なサンプルホルダーの開発に成功した。図3に試料厚み可変サンプルホルダーを示す。

4. 研究成果

開発した積分球赤外分光システムおよびサンプルホルダーを使用し細胞試料の総透過率の測定を行った。細胞にはマウス骨髄由来間葉系幹細胞株 Kusa-A1 (Cell Bank, RIKEN BioResource Center) を用いた。FBS を 10 % 含む DMEM 培地でコンフルエントまで培養した未分化の Kusa-A1 細胞をセルスクレーパーで回収し、赤外透過性結晶 BaF_2 基板上に滴下し薄膜状の試料とした。波長域 $2.5\sim 12.5\ \mu\text{m}$ (波数域 $4000\sim 800\ \text{cm}^{-1}$)、分解能 $4\ \text{cm}^{-1}$ 、積算回数 1024 回で測定を行い、S/N 比の良い拡散透過率スペクトルを得ることに成功した。図4に間葉系幹細胞の総透過率スペクトルを示す。

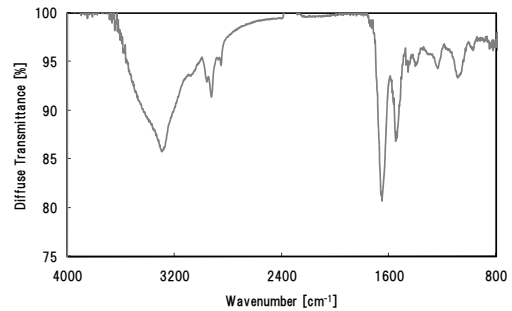


図4 間葉系幹細胞の総透過率スペクトル

本研究では、正確な試料厚みを設定可能な積分球赤外分光システムの開発を行い、間葉系幹細胞試料の総透過率スペクトル測定を達成した。中赤外域の正確な光学定数に関する知見は非常に少ないため、今後システムを改良し、様々な細胞・組織の中赤外域の正確な総透過率および拡散反射率を測定可能とし、計算プログラムを介して光学定数広帯域スペクトルを決定し、細胞・組織別で網羅的なデータベース化を目指す。本研究の最終目的は、赤外分光分析技術を利用し、細胞を生細胞(溶液状態)のまま、抗体標識を利用せずに低侵襲的に計測可能な非侵襲的細胞解析装置を開発することである。本研究により、移植細胞の信頼性・安全性の確保が可能となり、細胞移植治療の実用化加速に貢献できると考えている。

本アイデアにおいて、評価のパラメータは T や R ではなく物理定数である光学定数 (μ_a や μ_s) の適応を検討している。しかしながら、本研究では S/N 比の高い拡散反射率スペクトルの取得は達成できなかった。現状抱えている具体的な課題は以下のとおりである。①赤外白色光源を利用する場合、正確な拡散反射率測定のために光源の高出力化が必須、②細胞試料の分析形態(サンプルホルダーの改良)、③散乱の小さい中赤外域で従来の物理計算プログラムが適応できるかどうかである。

まず解決すべき課題は、高輝度光源の導入により正確な拡散反射率スペクトルを測定可能なシステムへと改良することである。今後は、赤外波長可変レーザーの導入(広帯域を高安定度で発振可能なレーザーの開発)を含めて光源強度を上げることに取り組む。現在、波長 $5.5\sim 10\ \mu\text{m}$ で可変可能な差周波発生方式の中赤外波長可変レーザーを開発したシステムへ導入し、生体組織の拡散反射率測定を試みている。現状、歯のような反射率が高いと予想される硬組織を試料として用いた場合に拡散反射率が測定可能な段階であり(図5)、今後システムの改良と共に、細胞試料の拡散反射率測定へと移行する

研究者番号：20512073

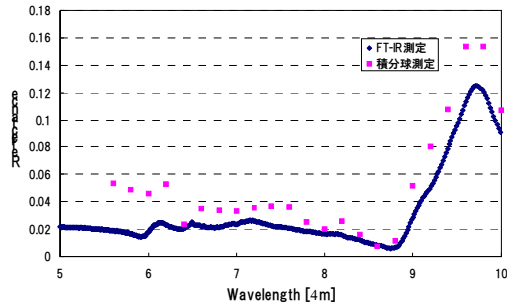


図5 歯（ウシ象牙質）の拡散反射率スペクトル

予定である。また、中赤外域における吸収係数および散乱係数算出のための理論および計算プログラムについて検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計4件）

- K. Awazu, K. Ishii, N. Honda: Determination of Tissue Optical Properties Using Double Integrating Sphere System for Advanced Laser Medicine. European Conference on Biomedical Optics (ECBO) 2009 (2009.6.14-18, ICM, Munich, Germany)
- K. Ishii, N. Honda, T. Terada, K. Awazu: Determination of Optical Property Changes during Laser Therapies. The 8th Pacific Rim Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO/Pacific Rim 2009) (2009.8.30-9.3, Shanghai International Convention Center, Shanghai, China)
- K. Ishii, N. Honda, Y. Kobayashi, T. Nanjo, T. Terada, K. Awazu: Optical properties of laser-treated tissues determined by double-integrating sphere system and inverse Monte Carlo method. 第30回日本レーザー医学会総会 (2009.12.2-3, グランドヒル市ヶ谷, 東京)
- 寺田 隆哉, 本多 典広, 石井 克典, 栗津 邦男: Inverse Monte Carlo 法を用いた生体組織の光学定数計測法の開発. 第30回日本レーザー医学会総会 (2009.12.2-3, グランドヒル市ヶ谷, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 克典 (ISHII KATSUNORI)
大阪大学・工学研究科・助教

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし