



## 生体内で小分子薬剤の濃度分布を 可視化する

### Visualization of Spatial Distribution of Small Drug Molecules inside Biological Tissues

三 沢 和 彦<sup>a</sup>, 寺 田 純 雄<sup>b</sup>

Kazuhiko Misawa and Sumio Terada

<sup>a</sup>東京農工大学大学院工学研究院

<sup>b</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科/  
脳統合機能研究センター

**要 旨** 蛍光標識では可視化が難しかった生体内の小分子（吸入麻酔薬分子，ステロイド分子，アミノ酸，ビタミン類など）の局在分布を画像化することを目標に，位相制御コヒーレントラマン顕微鏡を開発した。この装置を用いて，麻酔薬分子の画像化，イカ神経細胞中の薬剤分子の検出，マウス角膜中のタウリン分子浸透過程の測定に成功した。測定対象を選ぶことにより，生命科学や医療の分野で限らない応用がひろがるものと考えられる。

**キーワード**：コヒーレントラマン散乱顕微鏡，小分子薬剤の濃度分布，フェムト秒パルスレーザー，麻酔薬分子，角膜浸透

#### 1. 生体機能の分子機構解明

生命科学や医療の分野において，細胞や体内組織で分子の空間濃度分布を観測することは，非常に有用である。なぜなら，様々な生命現象や機能を明らかにするには，機能に関わる分子の局在を知ることが不可欠だからである。実際，薬や化粧品の成分が生体内のどこにどの程度分布するかを観察することで，効能や副作用に関する重要な手掛かりを得ることもできる。薬剤に限らず，変性タンパク質やがん細胞といった周囲の正常細胞とは異なる細胞が検出できれば，医療の現場に新たな診断手法を提供することにもなる。

共焦点レーザー顕微鏡や多光子励起顕微鏡の普及，さらには近年急速に発展した超解像技術など，新規の測光原理にもとづく光学顕微鏡の出現は，広く生命科学領域全体に多大な貢献をもたらしてきた。蛍光顕微鏡では，分子を同定するのに蛍光抗体法など，蛍光分子で標識する方法に頼ってきた。

我々のグループでは，蛍光標識では可視化が難しかった生体内の小分子（吸入麻酔薬分子，ステロイド分子，アミノ酸およびアミノ酸誘導体，ビタミン類など）の局在分布を画像化することを目標に技術開発を行っている。

たとえば，セボフルランをはじめとする，医療現場で常用されるガス麻酔は，経験則によって使用されている<sup>1)</sup>。なぜガス麻酔により神経信号の伝達機能が抑制され，再び回復することができるのか，その分子レベルでの機構はいまだ解明されていない<sup>2)</sup>。その理由の一つに，麻酔ガスそのものの局在を明らかにする観測手法が知られていなかったことが挙げられ，このことが生体内での小分子薬剤の濃度分析を可視化する強い動機づけとなっている。

#### 2. ラマン散乱顕微鏡

近年，急速に発達してきたラマン散乱による顕微イメージングは，観察対象をありのままの状態を観察できることが最大の特長である。我々の観察対象とする分子の多くは原子が十数個程度の小分子であり，より大きな蛍光色素分子を標識として付けることで，本来の機能を損なうおそれがある。ラマン散乱顕微鏡では，レーザーで励起した観察対象分子から放出される信号光の周波数を分析することにより特定の分子振動を同定する。そのため，蛍光標識などを付けずに，特定の分子が顕微鏡の視野内でどこに局在するかを検出できる。このラマン散乱顕微鏡の技術開発は海外のみならず，日本国内でも優れた成果がうみだされている<sup>3,4)</sup>。

#### 3. コヒーレントラマン散乱顕微鏡

ラマン散乱顕微鏡には，大きく分けて自発ラマン過程とコヒーレントラマン過程を用いた2種類あるが，特に後者は前者に比べて，信号強度が強く励起強度を下げられることから，生体試料の損傷を避けることができるなどの長所を有している<sup>5,6)</sup>。コヒーレントラマン散乱顕微鏡についても多くの解説記事があるが<sup>7-9)</sup>，ここにその特長をまとめてみよう。

- 非破壊・非接触測定で，分子構造の特定も可能である
  - 大気中常温で水分を含む試料にも適用でき，試料の前処理が不要
  - 特に奥行き方向にも光の波長程度の空間分解能を持ち，試料深さ方向の分布測定により3次元画像も構築可能
  - 信号光波長が入射光よりも短いため，蛍光性試料でも観察可能
  - 高速撮像も可能，ビデオレートでの動画も報告されている
- コヒーレントラマン過程は，周波数の異なる2本のレーザー光を分子に同時に照射し，2本のうちの周波数（2本のレーザー光の周波数差）を分子の持つ固有な振動の周波数に合わせることで，分子を強制的に振動させる。強制的に振動を引き起こされた分子に，3本目のレーザー光を照射すると，入射した光の周波数と分子振動周波数との和周波数を持つ新しい光が放出される。この信号光の周波数から，分子固有の振動周波数を知ることができる。従来のコヒーレントラマン

<sup>a</sup> 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16

TEL & FAX: 042-388-7485

<sup>b</sup> 〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45

2015年6月12日受付

表 1 本装置の開発前後における操作性の違い

	開発前	新ユニット
装置の調整頻度	毎日調整	連続1ヶ月無調整
日常的に電源オン後使用できるまで	1~3時間要調整	即時測定可能
設置後初回調整にかかる時間	半日~1日	3時間以下

分光法では、これらの複数のレーザービームを別々に用意していた<sup>10)</sup>。しかし、それら複数のビームを顕微鏡下で1点に正確に合わせる必要があるなど、レーザー分光の専門家以外が測定するのは容易ではなかった<sup>11,12)</sup>。我々は、この分子振動スペクトルを測定する新たな手法として、図1に示すようなスペクトル位相を操作したパルスレーザー光を用いる「位相制御コヒーレントラマン顕微鏡」を開発した<sup>13~15)</sup>。

我々の方法では、広いスペクトル帯域をもつ単一の超短パルスレーザー光を用いている。上で述べた3本の光の役割を担う各々の周波数成分を区別するのに、図2に示す位相制御装置でパルス光の位相を調整した。位相制御装置の内部には分散補償機構、狭・広帯域光の分割・合波機構、狭帯域光の高速位相変調機構を内蔵している。回折格子により、光パルスに含まれる周波数成分に分け、液晶空間光変調器により、各周波数成分に最適な位相ずれを与える。相対的に位相差が与えられた全周波数成分を再び合成して、1本のレーザービームとして出力する。この方法では、1台のレーザー装置から出る単一のレーザービームを顕微鏡に導入するだけで済むため、生命科学や医療分野へ活用するのが容易になった。光軸調整の容易さや安定度は格段に進歩したために日々の調整は不要になり、即時測定が可能になった状態になっている。本装置の開発前後における操作性の違いを表1にまとめる。

#### 4. 麻酔薬分子の画像化

医療現場で常用される薬剤のうち、小分子でありラベル付けが困難な分子試料の例として吸入麻酔薬を取り上げる。顕微画像取得に先立ち、開発した光位相制御ユニットを用いて、代表的な吸入麻酔薬であるセボフルラン・イソフルランの分子標識を取得した。図3に示すように、セボフルランに関しては720, 850  $\text{cm}^{-1}$  付近に非常に明瞭な分子振動スペクトルのピークを見出すことができ、このラマン信号を指標として濃度分布画像を取得した。

ピエゾ素子駆動の精密移動ステージを顕微鏡試料部に取り付けることで、 $300 \times 300 \mu\text{m}$  の範囲を  $1 \mu\text{m}$  以下の位置分解能で試料の2次元走査を可能とした。また、光軸方向にも  $100 \mu\text{m}$  の可動範囲を設けており、 $300 \times 300 \times 100 \mu\text{m}$  の立体空間の濃度分布画像の取得が可能となった。ビームサイズから見積もられる空間分解能は、現在使用の対物レンズで理論上  $0.71 \mu\text{m}$  であるが、現状での空間分解能はXY方向  $1.7 \mu\text{m}$ 、Z方向  $1.4 \mu\text{m}$  である。また時間分解能は、1ピクセ

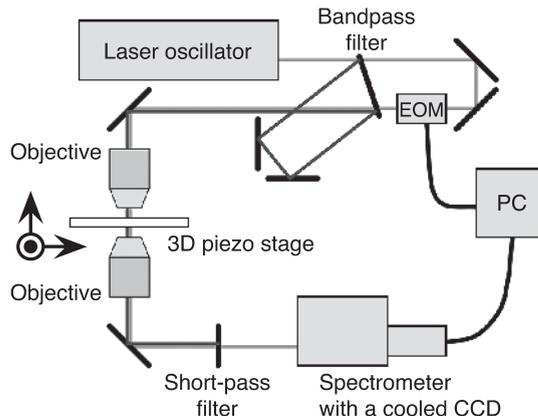


図1 位相制御コヒーレントラマン顕微分光装置の構成図

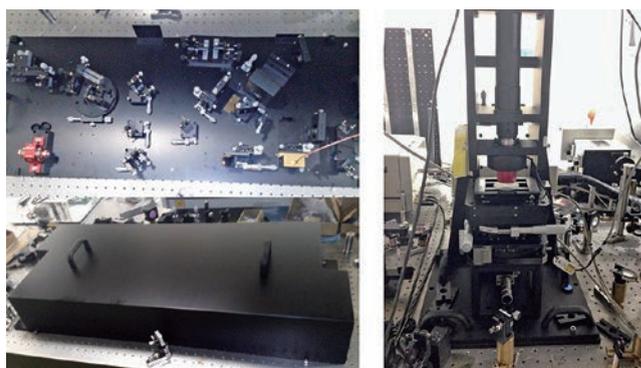


図2 開発した光位相制御ユニット（左）とコヒーレントラマン散乱顕微鏡（右）の写真

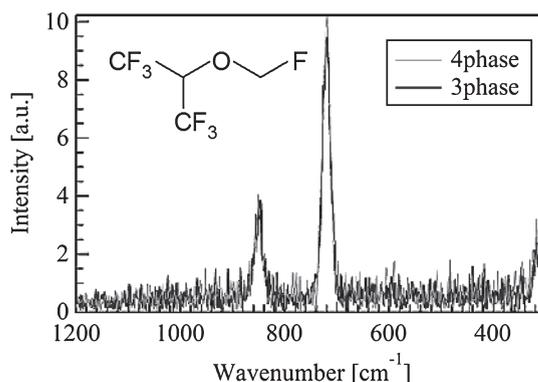


図3 吸入麻酔薬セボフルランのラマンスペクトル。分子構造を挿入図で示した。

ルあたり68ミリ秒を実現した。

周囲を水が満たしている生体環境を模倣した試料として、水が充填されたサンプルセルにセボフルランを導入し、その微小液滴を観測対象とした。セボフルラン液滴の体積はピコリットル程度で無色であるが、水との屈折率の違いからCMOSカメラでもその存在が確認できる。試料平面の各部位ごとにラマンスペクトルを測定し、このスペクトル情報を基に濃度分布画像の構成を行った。100  $\text{cm}^{-1}$  刻みにラマン信号の積分強度を算出し、この積分強度の空間位置依存性を波

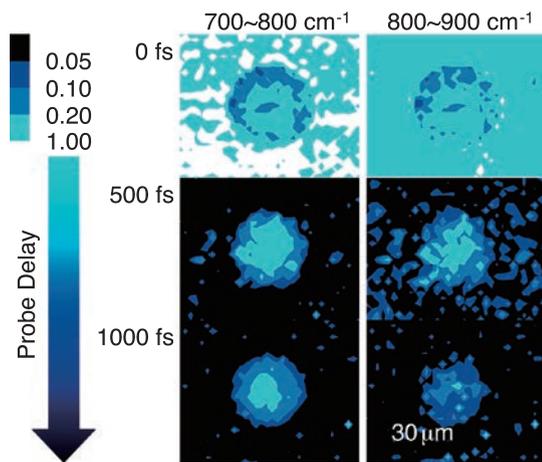


図4 ポンプとプローブとの間の遅延を変えて複数のスペクトル領域にわたって積分したラマン信号強度の二次元画像

数領域ごとに表した結果が図4である。図3にあるように、セボフルランの主要なラマン信号ピークは700 cm<sup>-1</sup>台にあり、実際に700 cm<sup>-1</sup>台のラマン信号を基にして構成した画像ではセボフルランの液滴の概形を明瞭に見出すことができる。また、セボフルランのラマン信号のサブピークが存在する800 cm<sup>-1</sup>台の信号を用いた2次元画像でも、うっすらとその存在を確認できる。麻酔薬分子の分布画像取得は、我々のグループで開発した装置で初めて可能となった。

特に、生体分子への応用に際しては、水由来の背景ノイズの低減が重要な解決課題となる。図4のセボフルラン液滴の周囲は水で満たされており、水由来の強大なラマンスペクトルが観測されてしまう。水分子の影響の除去には、時間分解分光による信号分離法を用いる<sup>16)</sup>。一般に、水分子どうしの水素結合により、水分子の分子振動エネルギーは即座に水素結合ネットワークを通じて散逸するため、水による信号の寿命が最も短いと考えてよい<sup>17)</sup>。図1の位相制御装置では、分子振動を強制的に励振した直後から、ラマンスペクトルを測定するまでに任意の時間差をつけることもできる。このことにより、水分子の影響は除去されて、測定対象の分子の信号だけ抽出できることになる。実際に図4の2次元画像で示したように、遅延時間を大きく取るにつれて、水が存在する領域の信号強度を選択的に低減でき、水中に分散された麻酔薬分子の分布を高いコントラストで撮像することが可能となった。このように、コヒーレントラマン過程の水に強い特徴を生かして、生体試料の計測への応用が期待できる。

### 5. イカ神経細胞中の薬剤分子の検出<sup>18)</sup>

図5左は、巨大軸索とよばれるイカの神経突起内に、セボフルランの液滴を注入した直後の顕微鏡写真である。中央に黒く見える球状の部分が、注射器(△)によって軸索内に注入されたセボフルラン液滴である。両矢印(⇔)は軸索の横断面方向である。点Aは液滴の中心付近、点Bは液滴の外周部、点Cは液滴から離れた位置となっている。セボ

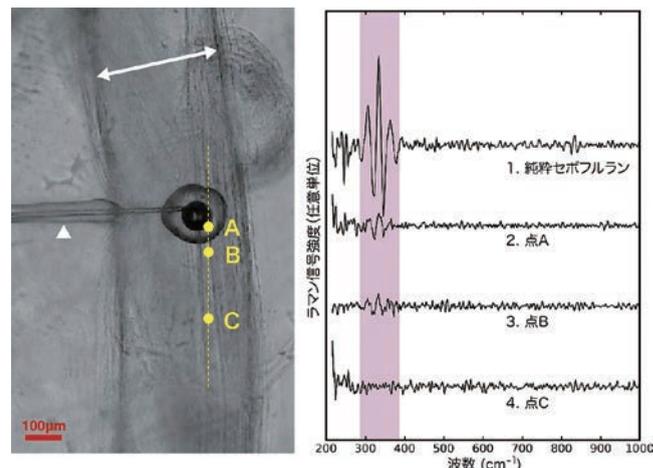


図5 左: イカ巨大軸索中に注入されたセボフルラン液滴の顕微鏡写真. 右: 純粋セボフルランのラマンスペクトルおよび、顕微鏡写真中のA, B, C各点におけるラマンスペクトル.

フルラン分子は、注入直後から細胞内部で急速に拡散していく。ただし、この顕微鏡写真だけでは、濃淡から形状がわかるだけで、そこに含まれる物質の組成はわからない。

図5右は、顕微鏡写真中のA, B, C各点におけるラマンスペクトルを測定した結果である。グラフの最上部に示した純粋セボフルランのスペクトルで、網掛けした領域に現れるスペクトルパターンを指標とした。なお、この測定を行ったのは、まだ図1のシステムを構築する以前であり、300 cm<sup>-1</sup>付近の低波数領域を主な測定範囲としたものである。位相変調のかけかたも異なっており、スペクトル波形も前掲の図3とは直接比較できないことにご留意いただきたい。点Aと点Bではセボフルランに特徴的なパターンがみられることから、液滴の中心付近と滲み出た外周部分にセボフルラン分子が存在することが確かめられた。一方、液滴中心から遠い点Cには、セボフルラン分子は検出限界以下であることもわかる。このように、生きた細胞中での麻酔ガス分子の位置を特定することができた。

### 6. マウス角膜中におけるタウリン分子透過過程の測定<sup>19)</sup>

別のモデル物質として、アミノ酸類似分子のタウリンを選択した。ラマン散乱スペクトルでは、水溶液中で1033 cm<sup>-1</sup>

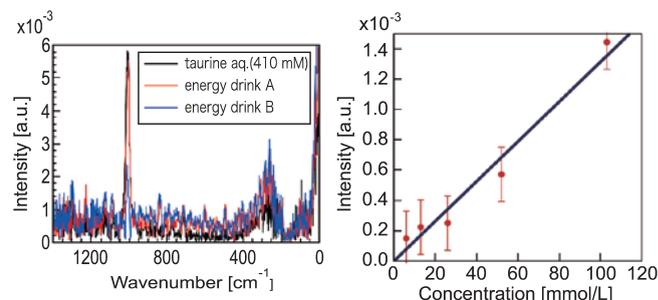


図6 タウリンのラマンスペクトル(左)と検量線(右)

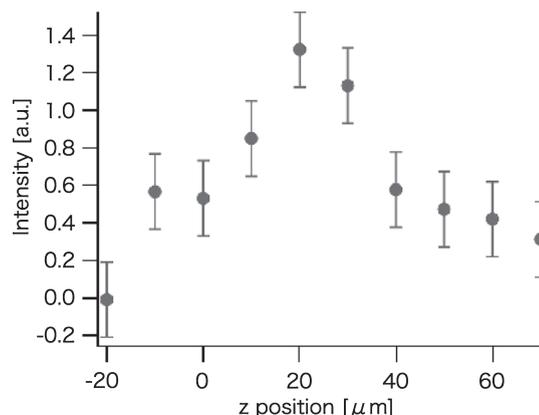


図7 角膜試料内で角膜試料での深さ方向のスキャン測定結果。エラーバーは信号がない部分の信号強度のばらつきから推定した。

の信号を観測でき、濃度は3 mM程度まで検出できた(図6)。分子濃度に対するラマン信号強度を検量線として測定することで、同一試料内での相対的な分子濃度の推定が可能となる。なお、試料が異なる場合は光の散乱など条件が変動するため、絶対的な分子濃度を決定することは困難である。

このタウリンを生体組織中で測定することを目指し、マウスより採取した角膜組織をタウリン溶液に浸漬した標本をモデル系とした。図7はタウリン溶液に浸漬した角膜標本中の、タウリンの角膜深さ方向での濃度プロファイルを測定した結果である。横軸は角膜の上皮表面からの深さの位置、縦軸はラマン信号強度を示す。コヒーレントラマン散乱信号は、角膜上皮面から20–30 μm 辺りで極大を示す傾向が見られた。マウスの角膜の典型的な厚さは、100–150 μm程度である。タウリン分子の奥行き方向で一様でない分布は、上皮層と内皮層との透過性の違いがその背景にあるものと考えている。対照として、凍結、薄切、乾燥した角膜標本で、フーリエ変換赤外分光(FT-IR)顕微鏡を用いて測定すると、角膜のほぼ同じ深さで極大を示した。

FT-IR測定では、深さ方向の空間分解能を向上させるために凍結かつ薄切が必要であり、また水の影響を避けるために乾燥が必要となる。コヒーレントラマン散乱顕微鏡では湿潤な試料を薄切せずにそのまま観察することができたことから、生きた組織内での小分子の分布を測定する上での有用性が実証された。

## 7. 社会的意義・今後の展開

我々のグループでは、コヒーレントラマン顕微鏡をユーザーが比較的容易に操作できるように分光計測に必要な光源を一体化した製品として開発した。本方法は、蛍光標識の付けられない吸入麻酔薬等の小分子について、生体内における濃度分布の画像化を可能にする。測定対象を選ぶことにより、生命科学や医療の分野での応用が期待される。例えばステロイド含有の外用薬が皮膚へ浸透していく様子を可視化してそ

の反応過程を追うなど、これまで見えなかった様々な分子の生体内における反応に関する研究へと発展させたいと考えている。

一般的な薬剤の投薬濃度はサブ mM/L であるため、さらなる感度向上が必要である。そのために、現在、ロックインカメラを用いた高速変調撮像、周波数フィルタや独立成分分析等のノイズ除去処理を検討している。更なる高感度化により、より微量の薬剤分子が計測できるように改良していく。

## 謝 辞

本装置の開発には、林真澄氏(ワイヤード株式会社)の貢献が大きい。また本装置を用いての実際の研究は、長島優氏(東京大学)、鈴木隆行氏(明治大学)、小原祐樹氏(東京農工大学)、川岸将彦氏(東京医科歯科大学)が参画した。

本研究は、H26年度までJST先端計測分析技術・機器開発プログラムにより、H27年度からはAMED先端計測分析技術・機器開発プログラムにより実施された。

## 文 献

- Wallin, R.F., Regan, B.M., Napoli, M.D. and Stern, I.J.: *Anesth Analg.*, **54**, 758–766 (1975)
- Campagna, J.A., Miller, K.W. and Forman, S.A.: *N. Engl. J. Med.*, **348**, 2110–2124 (2003). doi: 10.1056/NEJMra021261
- 岡田昌也, 藤田克昌: 京都府立医大誌, **122**(4), 199–208 (2013)
- 岡田昌也, 袖岡幹子, 藤田克昌: 生化学, **86**(2), 137–144 (2014)
- Cheng, J.X., Volkmer, A., Book, L.D. and Xie, X.S.: *J. Phys. Chem. B*, **106**, 8493–8498 (2002)
- Camp, C.H. Jr, Lee, Y.-J., Heddleston, J.M., Hartshorn, C.M., Hight Walker, A.R., Rich, J.N., Lathia, J.D. and Cicerone, M.T.: *Nature Photonics*, **8**, 627–634 (2014)
- Cheng, J.-X. and Xie, X.S.: *Coherent Raman Scattering Microscopy* CRC Press (2013)
- 橋本 守: レーザー技術, **31**(6), 375–379 (2005)
- 藤田克昌: 顕微鏡, **43**(4), 268–272 (2008)
- Ozeki, Y., Umemura, W., Otsuka, Y., Satoh, S., Hashimoto, H., Sumimura, K., Nishizawa, N., Fukui, K. and Itoh, K.: *Nature Photonics*, **6**, 845–851 (2012)
- Roy, S., Wrzesinski, P., Pestov, D., Gunaratne, T., Dantus, M. and Gord, J.R.: *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 074102 (2009)
- von Vacano, B., Buckup, T. and Motzkus, M.: *Opt. Lett.*, **31**, 2495–2497 (2006)
- Oron, D., Dudovich, N. and Silberberg, Y.: *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 273001 (2002)
- Nagashima, Y., Suzuki, T., Terada, S., Tsuji, S. and Misawa, K.: *Proc. SPIE*, **7376**, Laser Applications in Life Sciences, 73760S (2010). doi: 10.1117/12.871162
- Suzuki, T. and Misawa, K.: *Opt. Express*, **19**, 11463 (2011)
- Volkmer, A., Book, L.D. and Xie, X.S.: *Appl. Phys. Lett.*, **80**, 1505–1507 (2002)
- Winkler, K., Lindner, J. and Vöhringer, P.: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **4**, 2144–2155 (2002)
- Nagashima, Y., Suzuki, T., Terada, S., Tsuji, S. and Misawa, K.: *J. Chem. Phys.*, **134**, 024525 (2011)
- Kawagishi, M., Obara, Y., Suzuki, T., Hayashi, M., Misawa, K. and Terada, S.: *Biophysical Journal*, **108**S1, p626a, 27 (2015)