

学 位 論 文 題 名

Absorbance measurement in turbid media by
photon correlation spectroscopy and its application
to biological systems

(光子相関分光法による散乱媒質中の吸収測定とその生物系への応用)

学位論文内容の要旨

多重散乱媒質中での吸収定量法は現在のところ確立されていない。このような媒質では光が散乱を受け直進せずその光路長が物理的長さと一致しない。そのため透明溶液での Beer-Lambert 則がそのままは適用出来ないからである。散乱媒質中での光路長を測定する方法として TOF (time of flight) 法があり、これによって直接、光の飛行距離を求め、吸収定量する方法が提案されている。しかしこの方法は短パルスレーザーを用いるため装置の取り扱いが大変でしかも高価な検出器が必要である。本研究ではこの手法とは全く異なる光子相関分光法を用いた散乱媒質中での吸収定量計測法を提案し実験的に確かめた。またその生物系への応用の可能性を探った。

本手法の基となる動的光散乱(dynamic light scattering:DLS)法は物理化学の分野でよく利用されている計測方法である。散乱媒質中（単散乱領域に限定）での粒子が運動することにより光の位相が変化し、その結果強度が変動する。この変動の程度は光強度の自己相関関数で表され、フォトンカウンティングレベルにおいて光子相関分光法(photon correlation spectroscopy: PCS)を用いて計測出来る。

相関関数の減衰は媒質中の粒子の動きを反映しておりその動きから粒子自身の形、運動性に関する情報が判ると共に逆に粒子自身の特性がわかっているときは、粘性など媒質の特性も知ることができる。さらに DLS を多重散乱領域に拡張した拡散波分光法(diffusing wave spectroscopy: DWS)と呼ばれる手法が提案されている。一般に多重散乱領域での光強度変化は単散乱領域に対して速くなり相関関数の減衰も速くなる。これは何度も光が散乱を受けその度に強度が変動しそれが蓄積していくためである。散乱媒質中の光路長分布は散乱回数の関数なので多重散乱領域における光強度の変化には光路長分布を介して吸収情報を含んでいるはずである。事実、DWS における光強度の自己相関関数は光路長分布関数のラプラス変換の形で表されており、光路長分布は媒質に含まれる吸収に依存する。従って自己相関関数は吸収量の関数となる。これを解析することで吸収量を定量できる。本研究はこの点に注目し散乱媒質中での吸収定量法における新たな計測法を提案、実証した。

本研究において散乱媒質としてイントラリピッド 2 % 溶液（静脈注射用乳剤）、吸収体として CuSO_4 を用いた。イントラリピッドは生体を模擬した実験によく使

われておりその特性も既知である。CuSO₄ は発光が無く散乱媒質とも相互作用しないため使用した。光路長分布関数が上記のように表されるとすると媒質中に吸収体が存在する時の自己相関関数はその関数を時間的にシフトさせるのみでありそのシフト量は吸収量に比例する。イントラリピッド2%溶液に徐々に吸収体の濃度を増加させたところ相関関数は徐々に遅く減衰することが確かめられた。相関関数を3次のキュムラント関数でフィットし、吸収を含まない時の関数を基準に吸収を含む関数の時間的なシフト量をそのパラメータから計算した。その結果加えた吸収量と相関関数の時間的なシフト量は比例関係を示した。傾きから得られたモル吸光係数は $10.5 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、これは CuSO₄ のそれ ($10.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) とほぼ一致した。この結果は他の手法を用いた精度と同程度である。

散乱媒質中における単一波長での吸光度が PCS を用いて求まることを実証したが、さらに波長に対する吸光度変化つまり吸収スペクトルが得られれば吸収体の性質を知ることができる。原理的には単一波長での作業をすべての波長で行えばよいがこれには大変な労力が必要となる。そこで単一波長でのパラメータとそのパラメータの波長依存性を検討することで波長に依存しない一般的な形で DWS を記述し、741-842nm 間の CuSO₄ と Acid Violet の吸収スペクトルを 750nm の吸光度を基準に求めた。高濃度での吸収量に対しては若干誤差があるもののほぼそれぞれの吸収スペクトルを再現出来た。

さらに2種類の生物試料(パン酵母、灌流したラットの肝臓)を用いて PCS の応用の可能性を確かめた。市販のパン酵母の懸濁液にその活性を低下させるための KCN(青酸カリ)及び TCA(トリクロル酢酸)を加え、それぞれの懸濁液の強度自己相関関数を測定した。KCN はミトコンドリアの酵素を阻害し好気代謝を止めるが、測定時間内ではミトコンドリアの活動を完全には止めないためその関数は酵母そのものと大きく違わなかった。しかし TCA を加えた懸濁液はその関数の形が酵母のみの時とは異なった。これは TCA が細胞内タンパクを変性させ細胞内物質の動きを即時に止めたためその動きによる影響が無くなったためだと考えられる。このように PCS で細胞内レベルでの動きを計測出来る可能性が確認出来た。また酵母の viability は MB(メチレンブルー)での染色の度合で決定される。そこで MB の吸収特性を利用して、懸濁液レベルで viability の評価を PCS を用いて試みた。その結果 viability が悪いほど MB に染色されその結果 MB の吸収効果で相関関数の減衰は遅くなった。相関関数を3次のキュムラント関数でフィットした時の1次の係数が viability の指標になることが見出せた。

次に灌流したラットの肝臓に対してその強度相関関数を計測した。灌流液に色素(Rhodamine 6G)を加えるとその吸収効果により相関関数の減衰が遅くなった。これはイントラリピッドを用いた結果と一致する。さらに灌流、虚血、再灌流時の肝臓からの散乱光強度の相関関数を測定すると虚血時には灌流時とは異なる減衰を示し、再灌流時には虚血前の灌流時と同様な減衰に戻った。しかしながら、これらに関しては実験の回数が少なくまたプレパレーションごとの再現性が十分得られていないため今後さらに実験を繰り返す必要がある。

本手法は従来散乱情報の取得のために利用されていた PCS を新たに散乱媒質中の吸収定量に拡張したもので、今後懸濁試料の吸光度測定に幅広く利用できると確信している。今後は PCS を実用的な場面でより簡便にかつ安定に応用する

ために光学系をできるだけソリッド化し、さらに in vivo での基礎データを数多く取ることによって細胞レベルから組織レベルに至るまでの応用性を確認し、新たな計測手法として発展させて行きたい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守 副 査 教 授 魚 崎 浩 平
副 査 教 授 喜 多 村 昇 副 査 教 授 谷 口 和 彌

学 位 論 文 題 名

Absorbance measurement in turbid media by photon correlation spectroscopy and its application to biological systems

(光子相関分光法による散乱媒質中の吸収測定とその生物系への応用)

生体組織に代表される不均一多重散乱系において、媒質中に存在する吸収物質の定量法は現在まで確立されていない。このような散乱系では光が散乱により直進せず、その光路長が物理的長さと一致しないため、吸収定量における最も基本的なBeer-Lambert則がそのまま適用できないからである。最近になり、散乱媒質中で直接光の飛行距離を求め、吸収定量を行なうTOF (time of flight) 法が提案されている。本論文において申請者は、この手法と全く異なる光子相関分光法を用いた散乱媒質中の吸収定量法を新たに提案し、その妥当性を実験的に確認した。そして更にその生物系への応用の可能性を探った。

散乱媒質に光が照射されると、単散乱領域において粒子のブラウン運動により強度が変動する。この変動 (ゆらぎ) の程度は光強度の自己相関関数で表わされ、光子相関分光法 (photon correlation spectroscopy, PCS) で計測できる。一般に多重散乱領域における光強度のゆらぎは単散乱に比べて速くなり、自己相関関数の減衰も速い。これは繰り返し散乱を受けることにより、そのつど強度が変動し、それが蓄積していくためである。散乱媒質中の光路長分布は散乱回数の関数なので、多重散乱領域における光強度のゆらぎは結果的に光路長分布を介して吸収情報を含むはずである。申請者は上記の考察から、光強度の自己相関関数が光路長分布のラプラス変換の形で表わされることを導き、吸収項は自己相関関数の時間シフトで与えられることを示した。従って、この時間シフトをPCSで測定することにより、吸収定量が可能となる。

散乱媒質にイントラリピッドを、吸収体に CuSO_4 を、それぞれ用いて実験を行なったところ、吸収体の濃度と自己相関関数の時間シフトが比例することが見出され、得られたモル吸光係数は透明溶液での値と一致した。さらに波長依存性を調べ、一般的な形で自己相関関数の時間シフトより吸収スペクトルを得る方法を実証した。

次に、イースト (yeast) を用いて、本手法の生物試料への応用の可能性を示した。すなわちメチレンブルーを用いて、viability の程度と自己相関関数の時間シフトがほぼ比例することが見い出され、これは新たな計測手段の可能性を示したといえる。

以上、申請者は、従来散乱情報の取得のために利用されていた光子相関分光法を多重散乱媒質中の吸収定量に拡張したもので、今後、本手法は懸濁試料の吸光度測定に幅広く利用できると結論した。

よって申請者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。