



Title	Parallelized Raman and Dynamic Light Analysis for High-Throughput Biochemical Screening and Monitoring
Author(s)	廖, 浩翔
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96050
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (廖 浩 翔)

論文題名

Parallelized Raman and Dynamic Light Analysis for
High-Throughput Biochemical Screening and Monitoring
(高スループット生化学スクリーニングおよびモニタリングのための
並列ラマン分析法および並列動的光分析法の開発)

論文内容の要旨

Raman spectroscopy and dynamic light analysis have long been used to examine biochemical reactions. Raman spectroscopy is a powerful non-invasive compositional analysis method to study biochemical reactions such as drug effect in cells, and crystal form change during crystallization. Dynamic light analysis, such as dynamic light scattering and fluorescence correlation spectroscopy, is used to analyze particle size and molecule dynamics, which are important factors in crystallography and biochemical reactions.

Despite the potential of Raman spectroscopy and dynamic light analysis, their long measurement time limits their application to high-throughput screening and monitoring of biochemical samples, such as screening drug candidates for tumor cell treatment and crystallization kinetics under various conditions. Improving the throughput of Raman spectroscopy and dynamic light analysis can expand their applications. Current analysis methods for large sample volumes require measuring samples one by one, limiting the throughput for screening and monitoring.

In this dissertation, I parallelized the Raman spectroscopy and dynamic light analysis systems to simultaneously assess multiple biochemical samples in separate wells of a 96-well plate, which can improve their throughput by about two orders of magnitude compared to a conventional single-focus system and enable simultaneous monitoring of multiple conditions.

I developed a multifocal Raman spectrophotometer with 96 uniform power excitation to simultaneously assess the Raman spectra of 96 samples in a 96-well plate. The collection volume was optimized to collect the Raman signals from samples with submillimeter thickness, such as 3D spheroids and drug crystals. To demonstrate parallel measurement ability, I assessed the Raman spectra from 96 identical liquid samples and different crystal samples in a 96-well plate. To demonstrate its high-throughput Raman analysis ability, Raman spectra of over 150 spheroids treated with various concentrations of chemicals were examined in parallel, and concentration-dependent cellular responses were observed. In addition, I controlled the environment in the multifocal system and developed polydimethylsiloxane (PDMS) microchambers to allow in situ monitoring of biochemical reactions in cells and crystallization.

Biochemical reactions usually involve temperature change. To expand the application of the multifocal Raman system, I integrated a temperature control chamber into the system and demonstrated parallel Raman monitoring of cooling crystallization. The temperature changes in EtOH-H₂O mixture solutions across a 96-well plate were monitored at 30-second intervals using the O-H Raman band and confirmed using a thermocouple. The temperature difference between them was less than 1° C. Cooling crystallization under different drug concentrations was simultaneously monitored. Temperature changes, crystallization kinetics, and crystal form transformation were assessed by the Raman spectra. The evaluated transition temperature among different wells was consistent with other standard results.

Long-term monitoring in living cells is important to understand cell dynamics, such as chemical response, differentiation, etc. To monitor changes in the spheroid in parallel, I developed PDMS microchambers molded in a 96-well glass bottom plate to position spheroids and allow both spheroid culture and Raman monitoring at the same time. To minimize stress on the spheroids, I mimicked the cell culture incubator environment and investigated the excitation conditions that do not damage the spheroid. Spheroids cultured in the developed PDMS microchambers in the multifocal Raman system exhibited a growth rate similar to those in a commercial spheroid culture plate in the cell culture incubator, indicating the system's capability of Raman monitoring without damaging the spheroids. Finally, drug-treated spheroids were in situ assessed using time-lapse Raman observation, and time-dependent drug-induced cytotoxicity was observed.

Regarding parallel dynamic light analysis requiring high temporal resolution signal detection, I demonstrated the capability of using the multifocal spectrophotometer for this purpose without changing its components. By utilizing the kinetic read-out mode of the CCD camera, I achieved a sub-millisecond signal collection speed. The capacity for parallel size detection through DLS was verified by measuring beads of known size. The evaluated bead sizes corresponded to the specifications provided by the manufacturer, although a large number of data was required to average the noise in the current optical design.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (廖 浩 翔)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤田 克昌
	副 査	教授	井上 康志
	副 査	教授	吉川 洋史
	副 査	教授	南川 丈夫 (大学院基礎工学研究科)

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、レンズアレイと光ファイバーをベースとした光学系を提案し、多焦点励起と並列信号検出による、ラマン分光分析と動的な光散乱分析を可能とする原理の提案と、その実験的検証と装置化、および、開発した技術を利用した、高スループットな材料分析、生細胞の薬剤応答の分析に関する研究をまとめたものである。その成果は以下の通りである。

高スループットなラマン分光分析を可能とする多焦点ラマン分光装置の開発に成功している。光ファイバーを用いたビーム分割とレンズアレイを組み合わせ、高強度のレーザーにより 96 検体を均一に励起可能な光学デバイスを開発している。励起光開口数とピンホール径を最適化することで、細胞スフェロイド、薬剤結晶などの試料から高効率にラマン散乱光を検出できる分光光学系を実現している。標準的な 96 ウェルプレート内の試料の同時分析が可能なラマン分光装置の開発を行い、ラマン分光分析のスループットを 2 桁近く向上させることに成功している。開発した装置の応用研究を実施し、薬剤結晶の成分分析、および細胞スフェロイドにおける薬剤の投与量に応じた細胞内分子の変化を検出することに成功している。

開発した多焦点ラマン分光装置に温度制御チャンバーを組み込み、温度変化に起因する生化学反応の同時モニタリングを達成している。水のラマンバンドの強度変化を利用して、温度制御チャンバー内部における 96 ウェルプレートの温度の同時モニタリングを可能にしている。実際に低分子薬物の結晶化の過程をモニタリングし、温度変化、および薬剤の濃度に依存した、結晶化および結晶多形転移の評価に成功している。得られた転移温度は標準的な結果と一致していることを確認し、試料環境を制御しながらのラマン分光分析が可能であることを確認している。

単一細胞スフェロイドの培養と分析が可能なマイクロチャンバーを開発し、細胞スフェロイドの長期の光学モニタリング技術を実現している。96 ウェルプレート内にマイクロチャンバーを設置することにより、多数のスフェロイドの培養と並列ラマン光検出を可能にしている。細胞へのダメージを抑え、かつラマン分光分析の再現性が高く、十分な信号対雑音比が得られる光学条件、試料設置条件を見だし、細胞スフェロイドのタイムラプス計測による薬剤投与時の細胞毒性の検出に成功している。

96 ウェルプレート内の検体を並列に分析可能な動的な光散乱分析装置を実現している。CCDカメラの動的信号モードを用いて各ウェルからの光散乱強度の時間変化を同時計測する手法を提案し、実験的にその検証に成功している。微小粒子の検出において、0.3 ミリ秒の時間分解能での計測が可能であることを示し、実際に標準試料のサイズ計測を実施することで、開発した装置により並列動的な光散乱分析が可能であることを確認している。

以上のように、本学位論文は、ラマン分光分析、および動的な光散乱分析に関する技術において、分光検出と時間分解光検出のスループットを飛躍的に向上する手法を提案、実証しており、細胞分析や薬剤分析における分析技術の応用範囲を拡大している。細胞スフェロイド、薬剤の結晶や溶液などの高スループット分析、および経時モニタリングを実現しており、創薬、製薬における、薬効の検出や薬剤の製造など、多量の試料分析が必要な科学および産業分野に貢献することが期待される。

これらの結果は、応用物理学、特にナノフォトニクス分野における光計測工学、分光学、および分析化学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。