

Chemical Engineering Scope for Nano-Bio Technology

Tadafumi Adschiri

(Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University),

ajiri@tagen.tohoku.ac.jp

Nano Technology and Bio technology are considered as key technologies of the next generation industries and thus variety of researches in the inter-disciplinary field are being actively developed. Bio-nano technology has substantial potential for the programmed fabrication of structured materials, in which specific interactions between molecules of DNA or peptide are used to make hetero-assemblies of multi-component materials or nano blocks (biomaterials or bio reactive nano materials). Control of assembly and disassembly of variety of bio-molecules, the nano-blocks, will be a key of fabrication of multi-component and multi-structured materials.

Development of bio- nano technology directly related to the industrial use is important. Chemical engineering methodology will be required definitely for the fabrication of structured materials or devices, rapidly and in large scale in the industry. Essential unit processes in the field of nano bio technologies are 1) Nano block production, 2) Control of assembly and disassembly, and 3) Addressing of nano bio blocks. For making bio- nano technology to be a new key technology in future industries, establishment of structured knowledge platform is essential. This knowledge platform should structuralize the multi-disciplinary knowledge of nano-bio technology by linking Process-Structure-Function, recommend nano block and process candidates from product functions, and propose guiding principles for developing process, structure, and functions by design engines, and assist discovery and idea generation through the newest nano- bio informatics.

ナノバイオテクノロジー分野でのバイオインフォマティクス

本多 裕之 (名大院・工) honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

バイオ分子は、偏差ゼロの全く均質な分子であり、そのもっとも重要な機能は、ペプチドやタンパク質の持つ分子認識機能である。これは、類似分子の多い生体内においてきわめてスペシフィックな、機能であり、通常の有機無機の化学分子では持ち得ない特異な機能である。この分子認識機能の本質に迫るため、アミノ酸配列と結合強度に関するデータベースの構築とそこから結合ルールの抽出が期待される。ルール抽出できれば、ナノバイオテクノロジー分野で利用可能な新規ペプチドの探索が可能になり、さらにペプチド医薬の開発も可能になると考えられる。

近年ではペプチド固相合成法が進み、F-moc ケミストリーが注目されている。我々はこの方法を、血圧降下作用のあるアンジオテンシン阻害ペプチドの探索に応用した。ペプチドチップを用いてアンジオテンシン受容体のエピトープ解析を行った結果、配列特異的なアンジオテンシン結合ペプチドとして WIVIIY を見出した。この方法により我々は、WIVIIY だけでなく結合しない配列情報や、結合の弱い配列情報を同時に得ている。これらの情報と、上記の FNN を組み合わせることにより、新たな、そしてさらに高い結合活性を持つペプチド配列が探索できると考えている。実際にアンジオテンシンに結合するペプチドの配列規則をルールとして抽出することができた。これを、従来型の図書館型データベースと区別して、探索可能な(プロ-バブル)データベースと呼ぶ。このようにしてペプチドの機能を迅速に探索できれば、ペプチドチップとバイオインフォマティクスはバイオナノテクノロジーを支える技術として非常に重要な技術になるであろう。

Bioinformatics for R & D of Bio-Nanotechnology

Hiroyuki Honda (Dept. of Biotechnol., Nagoya Univ.), honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

Biomolecules such as protein or peptide have greatly high uniformity, which is characterized by high specificity on recognition, and the specificity is excellently high compared with chemical molecules. This highly specific binding should be employed for R & D in bio-nanotechnology field. For this way, the binding mechanism of such biomolecule should be analysed.

Peptide synthesizing technology in solid state is developing now. F-moc chemistry is one of the strong experimental methods. We applied this method to the development of a new inhibitory peptide for angiotensin, which is possible to use as an antihypertensive drug. We tried the epitope analysis of angiotensin receptor molecule using peptide chip and we screened the sequence-specific angiotensin binding region, VVIVTY.

From this method, we have obtained not only positive sequence VVIVTY but also informative data on peptide sequences with negative binding activity or slightly positive activity. The use of these data and informative analysis tool, fuzzy neural network (FNN), will make possible the screening of newly and more active peptide sequence. If the peptide screening or peptide design becomes speedy, the combination research with peptide chip and bioinformatics will strongly support the bio-nanotechnology using peptide.

中空バイオナノ粒子による遺伝子・タンパク質デリバリー

近藤昭彦（神戸大学工学部） kondo@cx.kobe-u.ac.jp

遺伝子治療は、癌などの難治療性疾患の治療法として期待されているが、安全でピンポイントに目的組織・細胞に高効率に遺伝子導入可能なキャリアーの開発が望まれている。本研究では、ウイルスの感染効率に着目して、ウイルスの表面抗原からなるタンパク質中空ナノ粒子を、遺伝子やタンパク質を目的細胞や組織にピンポイントで効率よく導入するナノキャリアーとして利用することを試みている。このために、ヒト肝臓に特異的な B 型肝炎ウイルス (HBV) の表面抗原である L タンパク質 (pre-S1 ペプチド+pre-S2 ペプチド+S タンパク質) を酵母細胞に発現させて得られるナノ粒子を用いている。L タンパク質を酵母で発現させた場合、可溶性タンパク質の 42% 程度まで生産できる。この酵母を破碎して、超遠心分離を繰り返すことで、L タンパク質ナノ粒子を得ることができる (平均粒子径 80 nm 程度)。精製した L 粒子内部に遺伝子をエレクトロポレーション法で導入し、培養細胞培養液に添加したところ、ヒト肝臓由来細胞にのみ効率的に遺伝子導入できた。また、ヌードマウス背部皮下にヒト肝細胞がん由来組織を移植したものは、尾静脈からの注射だけで、ヒト肝癌組織のみに遺伝子導入できた。この様に、L 粒子は *in vitro* および *in vivo* ともにヒト肝臓に対して高い特異性を示すことが明らかとなった。さらに、L タンパク質の C 末端側に導入したいタンパク質を融合すると、L 粒子の内部にタンパク質を封入でき、肝細胞内に効率良く導入できることが明らかになりつつある。また、pre-S1 領域の一部を抗体や各種のリガンドに置き換えることで、特異性を変換した各種ナノ粒子を作製して、各種細胞への標的化を行っている。こうした試みの現状を紹介する。

Hollow bionanoparticles for the delivery of genes and proteins

Akihiko Kondo (Kobe University) kondo@cx.kobe-u.ac.jp

Since gene therapy is recognized as one of the most promising cures for many diseases such as cancer, it is very important to develop the gene carrier, which are safe and can specifically and efficiently introduce genes into the target cells and organs. We have found that hepatitis B virus (HBV) envelop L particles, which are overproduced in yeast cells, form hollow nanoparticles displaying a peptide that is indispensable for liver-specific infection by hepatitis B virus in humans. In the present studies, the L particles have been purified, characterized, and examined for the applicability to the gene delivery system. To examine the L particles as gene carriers, a mammalian expression plasmid for GFP (green fluorescence protein) was incorporated into L particles by electroporation. The L particles containing the plasmid were added to the culture medium of human hepatoma HepG2 cells. In addition, the nude mice transplanted with human hepatoma HuH-7 cells were injected intraperitoneally with the L particles containing the plasmid. These experiments showed that L particles can specifically and efficiently deliver gene into human liver cells both *in vivo* and *in vitro*. In addition, we found that the L-particles containing proteins were prepared by fusing them to the C-terminus of L protein. Since pre-S1 region of L protein contain a specific host cell receptor-binding domain for human hepatocytes, we attempted to alter the cell specificity by genetically substituting a tailor-made receptor for the pre-S1 region. We are now evaluating the effectiveness of L particles as the novel drug delivery system, together with the genetically engineered L particles that can be applied for the pinpoint gene/protein delivery system to different tissues.

インハレーションのためのナノテクノロジー

神谷秀博（東京農工大学・BASE）kamiya@cc.tuat.ac.jp

呼気による薬剤の吸入法（Inhalation 法）は、呼吸器疾患への治療法であるとともに、肺内胞を経由しインシュリンなどを投与する患者への負担を低減した新しい薬剤投与方法である。しかし、口腔から気管、肺内胞までの器官内構造は複雑で飽和湿度状態であり、目的とする病変部位への正確な到達は極めて困難である。一方、気管、気管支などの疾患では、逆に薬剤が手前の口腔や肺深部に分布し、目的病変部位に正確に到達できない。この方法では、薬剤粒子は、キャリアー粒子上へ担持されて吸入器に充填、呼気によるキャリアー粒子からの薬剤の剥離、生体内への薬剤の輸送、目的部位での捕捉、溶解、病変部位への作用が開始するまでに起こる、付着・分離、流動、浮遊、捕捉、溶解等の特性の変化を測定評価した上で、ナノテクノロジーの手法で設計する必要がある。

本報では、正確な病変部位に高効率で薬剤を輸送するための薬剤粒子設計法の確立に必要な基盤技術を概観する。ナノテクノロジーの成果である粒子形態や表面ナノ構造と機能の制御法、薬剤表面とキャリアー粒子から目的部位、器官表面との相互作用のコロイドプローブ AFM 法による直接評価法、さらに評価結果に基づいた呼吸器内での粒子・流体挙動の計算機シミュレーション法等の確立などの課題整理を行う。

この薬剤と器官等との相互作用の評価に必要である肺への吸入製剤用の粒子径 $2\ \mu\text{m}$ 以下の薬剤粒子を使ったコロイドプローブの試作に図 1 に示したように成功した。乳糖キャリアー粒子等との付着力に及ぼす湿度や乳糖粒子表面粗度の影響を評価し、吸入時に速やかにキャリアーから薬剤を剥離させるための付着力制御事例等を紹介する。

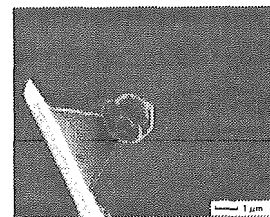


Fig. 1 Colloidal probe of fine drug particle

Nano-technology for Inhalation

Hidehiro Kamiya (Tokyo University of Agriculture & Technology) kamiya@cc.tuat.ac.jp

Inhalation method of the drug is new administration method of drug through the lung endocyst which reduced the burden to the patient. However, it is very difficult to accurately reach the organ of the lesion, because of the complicate structure in the organ from the oral cavity to lung endocyst and saturated humidity condition. On the contrary, in the case of diseases such as trachea and bronchi, the drug particles needs to actually distribute at lesion part between oral cavity and lung.

In this paper, the nano-technology for particle behavior design and simulation and modeling method to develop the actual transportation of drug particles to the lung was introduced. A colloidal probe atomic force microscope, AFM, method is useful to characterize the surface interaction between fine drug and charier particle, lesion part in the organ. As shown in Fig. 1, it succeeded to prepare a colloidal probe of fine drug particle with smaller than 2 μm in diameter. By using this probe, the effect of surface roughness on charier and humidity, temperature on the surface adhesion force distribution between drug and lactose charier particles were determined. Based on this results, the adhesion force control method by the surface molecular and nanometer scaled structure design was developed.

Session-1-2

**Development of delivery system for molecules and blood
cells by Nano-technology and Bioimaging**

- Special Lecture -

マイクロ・ナノビームアナリシス

二瓶 好正（東京理科大学・理工学部）nihei@ci.noda.sut.ac.jp

マイクロビームアナリシスとは、本来、光、電子、イオンなどを鋭いビーム状として物質の一部即ち局所（Local）または表面（Surface）を励起し、その部分の物質情報を獲得するものとして定義されている。測定の対象としては金属、半導体、セラミックス、高分子・ポリマー、生物試料、環境試料と誠に多種多様である。勿論、マイクロビームアナリシスは分析化学の一分野であり、物質に関する情報を獲得するための方法論を原理、装置、周辺技術、応用にわたって考究する基盤的な分野である。近年は、半導体工業のニーズが先導役となって、空間分解能に対する要求がますます高まり、また、材料分野、生物分野においてもより微細な対象の解析が必要となってきた。すなわち、マイクロからナノ領域へと要求が高まってきたのである。

マイクロ・ナノビームアナリシスは、局所・表面の形状、電子状態、元素分布、原子配列・分子構造、化学結合状態、光・熱・電気・機械・磁性等の諸物性に関する情報を獲得しようとしている。このために、物質と電磁波、電子、イオン、中性粒子、熱、電界、磁界などとの相互作用を利用する多くの方法論が適用されている。近年は、特定の試料断面イメージのみでなく、試料の3次元構造をイメージしたいとの要求にまで到達している。当日、このような要求に応えようとする最近の研究についてご紹介申し上げたい。

Recent Trends in Micro · Nano-beam Analysis

Yoshimasa Nihei (Tokyo University of Science) nihei@ci.noda.sut.ac.jp

The Micro-beam analysis is defined as the group of methods which use light, electron, ion in order to excite the local and surface area of materials, and to get the information on that materials. These methods are applied to get information on the many kind of materials such as metals, semiconductors, ceramics, polymers, bio-materials, environmental materials. Micro-beam analysis is the one of the field of Analytical Chemistry and substantial field in order to investigate on the principles, instrumentation, peripheral technology and application of the methodology. In recent years, the demands for the high spatial resolution in micro-beam analysis have been becoming higher and higher guided by the semiconductor industry, and the same kind of trends are realized in the field of material science and biological science. Namely, the demand for micro-beam analysis grows up gradually to nano-beam analysis.

The aims of micro-beam analysis is to get the information on the shape, electronic state, elemental mapping, atomic arrangement and molecular structure, chemical state, and the properties related to optical and other features. In order to get such kind of information, the many kind of interaction between solid and light, electron, ion are used as basic principle of methodology. Recently the demand for imaging of the intersection is become higher to the level of 3 dimensional imaging of the materials. I would like to introduce of the recent research that fulfill such kind of demands in my lecture.

Session-1-3

**Development of delivery system for molecules and blood
cells by Nano-technology and Bioimaging**

**- Application of Nano-Medicine: Evaluation by a novel technology
and Imaging -**

マイクロチップ技術を用いた生体成分の分析

中西博昭 (株)島津製作所・基盤技術研究所) nakanisi@shimadzu.co.jp

半導体製造分野で培われたフォトファブ리케이션などの様々な加工技術を応用して、ガラス、シリコンやプラスチックの基板の上に微小な流路や空間を作製し微量な流体を制御して化学分析や化学合成を行う、マイクロ分析システム (μ TAS : Micro Total Analysis Systems) の研究開発が近年世界的に盛んとなってきている。 μ TASの特長は、従来分析法と比較して、分析システムの小型化、サンプルや試薬の低減と廃液量低減、分析時間の短縮などが実現することにある。マイクロチップ電気泳動は、10数mm角サイズの基板の上に数 μ m～数100 μ m の微細流路を形成し、この流路中で電気泳動法による微量試料の分離を高速に行う分析手法である。1990年代はじめよりゲノム解析を主としたライフサイエンス分野での産業応用が近いと期待され、欧米を中心に活発な研究開発が進められてきた。そのような背景の中、(株)島津製作所は石英ガラスを材料としたマイクロチップ電気泳動装置を開発した。今回は、本装置と専用のチップを用いてタンパクの等電点電気泳動を試みた研究結果について紹介する。さらに、 μ TAS技術を応用してマイクロチップ中の微小空間で細胞を培養して、少数の細胞もしくは各細胞個々が産生する極微量の物質をモニタリングすることにより、細胞の機能解析や局所刺激による細胞応答の経時的観測が可能となる。我々は、生体高分子が担う細胞機能の経時的解析を行うことを目的として、チップ中の微小空間で細胞を培養し、マイクロバルブ等を用いて定量的な刺激を与え、その際の細胞応答をB/F分離なしで経時的に測定可能なシステムを開発している。具体的には、顕微鏡下で蛍光時間分解偏光解消法を適用して、夾雑蛍光を除去しながら経時的な測定を可能とするシステムである。今回は、ハイブリドーマが産生する抗体を経時的に検出した結果について報告する。

Microchip technology for bio-molecular analysis

Hiroaki Nakanishi (Technology Research Laboratory, Shimadzu Corp.)

nakanisi@shimadzu.co.jp

In recent years, bio-molecular analysis on μ TAS (Micro Total Analysis Systems) devices have attracted a growing interest. This paper presents 1) the microchip electrophoresis system “MCE-2010” using quartz glass chips and *in situ* monitoring of antibody production by hybridoma in a microfermentor are described. The most advanced feature of the MCE-2010 is a linear imaging UV detector along with a quartz microchip. Using the system, DNA and protein samples have been successfully analyzed without labeling with fluorescent reagent. The system needs no expensive reagent for DNA fragment analysis. Furthermore, the separation of proteins using microchip IEF (isoelectric focusing) can be achieved using MCE-2010. *In situ* monitoring of antibody production by hybridoma in a microfermentor was studied using time-resolved fluorescence (TRF) anisotropy analysis. The microfermentor has been fabricated on quartz glass and silicon substrates. The cell culture was succeeded in the microfermentor. The quantification of antibody was achieved by the method of TRF anisotropy analysis using Ru (II) complex-labeled-protein_A probe which can bind to the antibody specifically. We detected as small as 0.12pmol IgG (immunoglobulinG) without B/F separation on the chip.

フラッシュ軟X線イメージングの細胞診断への応用と可能性

眞島利和 ((独) 産総研・光技術・ライフエレクトロニクスラボ)

t.majima@aist.go.jp

バイオイメージングは、21世紀初頭の主たる研究課題の一つである。ナノバイオテクノロジーの分野での新たな発展が、医学から工業までの幅広い分野で求められている。加えて、特定の細胞における分子の作用や細胞間での分子の作用の「その場観察」が、ポストゲノムの時代の新たな課題となっている。フラッシュ軟X線イメージングは、生きている細胞の構造を光学顕微鏡よりも高分解能で観察することができる技術である。軟X線領域にある酸素の吸収端 (2.3nm) と炭素の吸収端 (4.4nm) の間の波長領域では、炭素の軟X線吸収率が酸素の軟X線吸収率をほぼ一桁上回っているため、この波長領域のX線を用いると、水分子による軟X線吸収の影響を抑えて、細胞をその主たる構成元素である炭素の密度分布として画像化できる。これにより、電子顕微鏡では困難であった水中で生きている細胞の水分に富んだ構造を観察することができる。フラッシュ軟X線イメージングにより、健全な細胞や病変細胞の機能的・構造的変化を炭素密度分布として高分解能で画像化できると期待される。

**Application of flash soft X-ray imaging to a diagnostic system
- a highly resolved structural and functional analysis of
normal and diseased cells -**

Toshikazu Majima (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)
t.majima@aist.go.jp

Bioimaging is one of the main issues of the first decade of this century. This trend is supported by technological attention spread widely from medicine to current industry in developing new fields of application of nanobiotechnology. In addition, *in situ* visualization of molecular interactions at a particular cell and/or cellular interactions in a particular tissue will be hot issues of the post genome age. Flash contact soft X-ray microscopy is one of the possible techniques to visualize the sub-cellular structures of living cells in water with higher resolution than conventional optical microscopy. In the soft X-ray wavelength range between the absorption edges of oxygen (2.3nm) and carbon (4.4nm), the X-ray absorption coefficient of carbon is about ten times larger than that of oxygen. Within this wavelength range, effect of X-ray absorption due to oxygen atoms composing water molecules inside and outside the cell can be suppressed. This means that one can obtain an X-ray image of living cells in water as a carbon density map. It is possible to observe the water-rich structure of the living cell, which has been difficult with conventional electron microscopy. Soft X-ray imaging will enable us to visualize functional and structural changes in normal and diseased cells by means of the carbon density distribution maps.

細胞障害機構をイメージングするためのプローブ

川西 徹 (国立衛研・生物薬品) kawanish@nihs.go.jp

蛍光プローブを細胞内に取り込ませ、その蛍光像を蛍光顕微鏡で捉え画像解析法により細胞内の生命現象を視覚化解析する方法が開発され、生物学医学領域で様々なブレイクスルーを生んでいる。この研究手法のメリットは、解析対象とする生命現象について、生細胞中において三次元的、あるいは時間軸を加えて四次元的に解析することが可能である点であり、生命現象のメカニズム研究に極めて有用である。演者らはこのような手法を用いて細胞障害機構の解析を行ってきたが、本講演では (1)細胞内カルシウムイオン、(2)細胞内ナトリウムイオン、(3)ミトコンドリア形態および膜電位、(4)カスパーゼ活性化、(5)過酸化物質の生成、(6)一酸化窒素産生 について報告する。

Fluorescent imaging probes for analyzing the mechanism of cellular injury

Toru KAWANISHI (Natl Inst.Health Sci.) kawanish@nihs.go.jp

Recently many breakthroughs have been achieved in the field of biological and medical sciences, using the experimental methods where the fluorescence probes are loaded into cells and the biological processes are analyzed from their images obtained with fluorescence microscopy. The experimental methods are suitable for the analysis of cellular injury mechanisms, because they enable us to carry out three dimensional analysis (or four dimensional analysis including time) of biological processes in living cells. Our group has studied on the mechanism of cellular injury using such kind of methods. In this presentation, the following parameters will be presented : (1) intracellular Ca^{2+} ; (2) intracellular Na^{+} ; (3) mitochondrial membrane potential; (4) Caspase activation; (5) hydroperoxides production; (6) NO production.

人工赤血球の輸血にともなう脳循環調節系への影響

塚田孝祐 (川崎医大・生理学) ktsukada@med.kawasaki-m.ac.jp

血液型に関係なく輸血可能である人工赤血球は救急医療や臓器保存など多彩な用途への有用性が期待される。本研究ではリポソームにヘモグロビンを封入した Neo Red Cell (以下 NRC, テルモ社製) および膠質液による交換輸血を行い, 脳微小血管における血流動態と酸素分圧を比較検討することで人工赤血球輸血時における脳循環調節系への影響を検討した。

Wistar 系雄性ラット 20 匹 (300-320 g) を任意に 2 群に分けて NRC 交換輸血群および 5 % ヒト血清アルブミン (HSA) 交換輸血 (血液希釈) 群とした。それぞれの輸注は 10 ml 行い, 1 ml 輸注毎に Ht を計測した。血流動態の観察は MCA 末梢枝を対象に, 赤血球を FITC で蛍光標識することで可視化解析した。一方, 脳表細静脈酸素分圧は予め股静脈より投与したポルフィリン分子のから発するリン光の酸素消光を利用することで計測を行った。

10 ml の HSA, NRC それぞれの交換輸血における Ht の計測から, 最終的な交換率は約 45 % と推定された。交換輸血前後で HSA 群に有意な細動脈の血管拡張および血流速度の増大が認められたが, NRC 群では有意な変化は認められなかった。血流速度と血管径から算出した細動脈血流量は交換輸血前後で HSA 群 NRC 群共に有意な増加が認められた。しかし NRC の血流量増加は HSA と比較すると有意に抑制されており, これは細静脈内酸素分圧の計測結果から循環血液の酸素含量の違いによるものと考えられた。以上より NRC は脳微小循環の血流動態を維持しながら酸素供給が可能であることを示唆する結果を得た。

Effect of artificial blood infusion on cerebral microcirculation

Kosuke Tsukada (Kawasaki Med. Sch.) ktsukada@med.kawasaki-m.ac.jp

Hemoglobin-encapsulated liposome is a kind of artificial blood, which has an advantage of blood type and antigen free. It is expected to be available for various medical treatments such as emergency medicine or organ preservation in future. Neo Red Cell (NRC, Terumo Corp.) has been shown on an experimental basis to have the same oxygen carrying capacity as human red blood cells. We performed animal experiments of exchange blood transfusion with NRC and human serum albumin, and determined the influence of viscosity and oxygen content on cerebral microcirculation.

Experiments were performed on 20 male Wistar rats weighing 300-320 g, and they were randomly divided into 2 experimental groups, exchange transfusion with NRC, and 5% human serum albumin (HSA). Blood exchange was performed by controlled arterial bleeding (0.5 ml/min) via the femoral arterial catheter. The withdrawn blood was replaced simultaneously by infusion of equal amounts of HSA or NRC via the femoral venous catheter. Total exchange volume of NRC or HSA were 10 ml, and Ht was measured every 1 ml exchange.

At the exchange of 10 ml of NRC, the final blood exchange rate was about 45% from results of Ht. In the HSA group, significant vasodilatations and increase of flow rate were observed, however, no significant change was observed in the NRC group. Blood viscosity change caused by blood transfusion did result in changes in blood flow. Here, increase of blood flow in the NRC group was significantly suppressed compared to the HSA group, which result in the difference of oxygen content between HSA and NRC. In conclusion, NRC maintains cerebral microcirculation and could deliver oxygen to tissue.

マルチフォトリックイメージングによる組織微小循環の機能解析
- 酸化ストレスに基づく内皮細胞傷害と血栓形成 -

南谷晴之、塚田孝祐*、関塚永一**、大塩力***

慶応義塾大学理工学部、川崎医科大学生理学教室*、国立埼玉病院**、大塩医院***

脳、肝臓などの臓器微小循環の血流動態を可視化するとともに、臓器内のマイクロレベルでの酸素代謝を同時計測し、組織や細胞の機能変化を観測することはフィジオーム研究の一重要課題となっている。本研究では、蛍光・燐光ナノプローブとバイオイメージング技術を利用した多波長励起のマルチフォトリックイメージングシステムを開発し、脳虚血に伴う微小循環血流の変化を FITC 蛍光色素で選択的に赤血球を標識し、励起波長 450nm、蛍光波長 520nm で可視化することで血流動態を定量解析した。また酸素感受性色素 Pd ポルフィリンをラット大腿静脈から投与し、波長 532nm のパルスレーザーで励起し、発光燐光 700nm をフォトマルで検出して酸素 Quenching 作用による燐光寿命の変化から微小血管内の酸素分圧を計測した。さらに NADH の紫外 370nm 吸光特性を利用して酸素供給の低下に伴ってミトコンドリア内に蓄積される NADH 蛍光輝度変化を可視化して虚血の指標を求めた。一方、虚血に伴う微小血管内の白血球と血小板の動態をそれぞれ Rhodamine6G と CFDASE で *ex vivo* 標識調整し、可視化を行った。これらのフォトリックイメージング法により、虚血脳表層組織の血流速度の低下、酸素分圧の低下、白血球の rolling と血小板の粘着亢進を観測定量化した。併せて *in-vitro* 培養細胞系を用いて酸化ストレスに基づく内皮細胞傷害と血栓形成の関連について精査し、活性酸素種の同定、内皮細胞の形態変化・アクチン重合・tight junction の喪失、白血球・血小板の内皮接着性の亢進を検討し、重要な知見を得た。