

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09396

研究課題名(和文) ラマン散乱光解析に基づく新しい非侵襲的な眼科診断機器の開発

研究課題名(英文) Development of new ophthalmic devices using Raman scattering.

研究代表者

加治 優一 (kaji, yuichi)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：50361332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン顕微鏡はレーザー光を対象物に照射して、得られる反射光を解析することにより、対象物の組成(タンパク質、脂質、DNAなど)を明らかにする装置である。我々は、レーザー光の強度を極限まで下げながら、得られる反射光の解析により、対象物である眼組織の組成を明らかにする顕微鏡の開発に取り組み、臨床的な応用について検討した。その結果、角膜及び網膜の層構造を明瞭に区別することができる顕微鏡の開発をすることができた。さらに角膜にコレステロールが沈着する高脂血症マウスにおいても、角膜におけるコレステロールの役割について明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼科学領域において頻用される細隙灯顕微鏡や光干渉断層計は、眼組織に光を照射して、その吸収具合をもとに疾患を推定する装置である。しかしながら、組織における光の吸収具合と、異常な光の吸収をもたらす原因の間には大きな乖離があった。我々はラマン顕微鏡を改良することにより、光の吸収具合だけでなく、その散乱光を解析することにより、異常な組織における脂質・タンパク質・核酸の局在をも明らかにすることができるようになった。今後の研究により、ラマン顕微鏡の有用性を活用する臨床応用機器が開発されることと思われる。本研究は世界に先駆けてラマン顕微鏡を眼科領域に応用する足がかりを得ることができたと確信する。

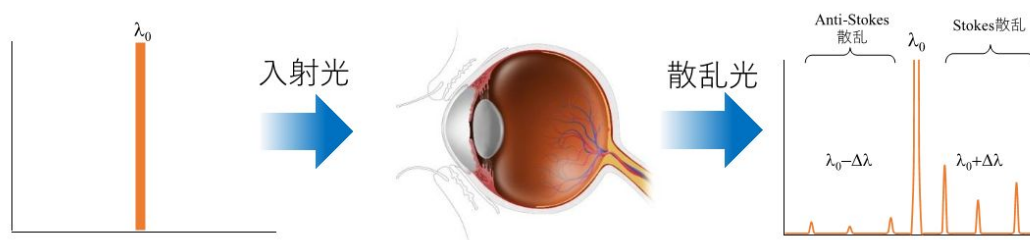
研究成果の概要(英文)：Raman microscope is used to obtain the molecular composition of target organs including lipids, DNA, and proteins in non-invasive manner. We have developed a microscope to visualize the localization of lipids, proteins, and DNA in retina and cornea. We also have revealed the accumulation of cholesterol in genetically-modified mice. In this way, we have revealed the scientific basis of new microscope to visualize the molecular composition of the target organ.

研究分野：眼科学

キーワード：ラマン顕微鏡 非侵襲的 顕微鏡 高脂血症 老人環 コレステロール

## 1. 研究開始当初の背景

医学領域において、画像診断の重要性は増しつつある。眼科領域においても細隙灯顕微鏡や眼底検査のような従来の画像診断だけではなく、光干渉断層計を用いた組織の断層画像が活用されるようになり、眼科診療を一変させている。しかしながら、光干渉断層計は物質の光の反射の違いを白黒の画像に変換したものであり、どのような物質が存在するかの情報は得られない。しかし、正常組織に物質が異常沈着した際に、それが細胞なのか、液体なのか、脂質なのかを判断することも大切である。我々は非侵襲的に組織においてどのような物質が存在・沈着しているかを明らかにする新たな診断装置の開発に取り組んだ。その手段としてラマン顕微鏡に着目した。ラマン顕微鏡は物質にレーザーを照射して、その散乱光を観察して、もとの入射光とは異なる波長の光 (Anti-Stokes 散乱および Stokes 散乱) の波長を解析することにより物質の組成を明らかにする手法である。



## 2. 研究の目的

ラマン顕微鏡は、非侵襲的に対象の物質中に存在する様々な生体分子 (蛋白質・脂質・核酸) を可視化させる装置である。ラマン散乱のシグナルは微弱なために、ラマン顕微鏡の生体への応用は進んでいない。われわれは、ラマン散乱を最大限にまで高めるコヒーレント反ストークスラマン散乱の原理を応用することにより、細胞レベルから *ex vivo* 組織レベルに至るまで、非侵襲的にプローブによる標識を行うことなく、様々な生体分子を可視化させることに成功している。本研究では、ラマン顕微鏡の臨床応用に向けた機器の基礎開発および *in vivo* の組織観察を可能とするラマン顕微鏡の開発を行う。まずは正常及び疾患を有する *ex vivo* 組織におけるラマン顕微鏡像を得る。次にコヒーレント反ストークスラマン散乱を用いた顕微鏡の改良とともに、病的な組織における異常沈着物質の組成を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

筑波大学眼科 (加治優一) と筑波大学数理物質科学研究科および九州大学理学部 (加納英明) は共同でラマンバイオイメージングセンターを立ち上げた。このセンターを基盤として、ラマン顕微鏡の開発と臨床応用の両輪をすすめることができる。臨床応用に向けた生体/組織の観察結果は、次世代のラマン顕微鏡の改良に必須であり、逆にラマン顕微鏡の改良に伴い生体/組織のラマン顕微鏡画像の可能性が広がることとなる。

1. 正常の組織を対象としたラマン顕微鏡による観察：正常の角膜、結膜、水晶体、網膜、硝子体におけるラマン画像ライブラリーを作成することで、正常組織における生体機能分子 (蛋白質、脂質、核酸) の局在を 3 次的に明らかにする。

2. 病的組織を対象としたラマン顕微鏡による観察：角膜ジストロフィ、角膜脂肪沈着、角膜アミロイド沈着疾患、白内障、加齢黄斑変性症モデル動物眼より *ex vivo* 組織を摘出して、ラマン顕微鏡における生体機能分子の局在を同定する。

## 4. 研究成果

眼科領域では角膜・結膜・水晶体・網膜・強膜の各組織におけるラマン顕微鏡像を得ることができた。それぞれの組織において細胞核・細胞外マトリックス (主にコラーゲン)・細胞膜を明瞭に区別する断層像を得ることができ、画像ライブラリーを構築することができた。さらに、甲状腺・副腎・動静脈のラマン顕微鏡像を得ることができた。

病的な角膜組織としては、ApoE ノックアウトマウスに伴う高脂血症によって角膜周辺部に

生じる混濁である老人環の観察を行った。正常角膜の実質には I 型コラーゲンを中心とする細胞外マトリックスが規則正しく配列しているものの、老人環においてはコラーゲンの配列が乱れるとともに脂質の異常沈着を観察することができた。角膜において異常な脂質の沈着を非侵襲的に検出することができれば、動脈硬化や高脂血症の補助診断となりうると思われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>加治優一                         | 4. 巻<br>24          |
| 2. 論文標題<br>スポーツにおける目の保護と糖化ストレス         | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Food STYLE21                 | 6. 最初と最後の頁<br>81-83 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし          | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>-           |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Sugiura T, Kaji Y, Tanaka Y.  | 4. 巻<br>44              |
| 2. 論文標題<br>Anatomy of the ciliary sulcus and the optimum site of needle passage for intraocular lens suture fixation in the living eye. | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>J Cataract Refract Surg.  | 6. 最初と最後の頁<br>1247-1253 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jcrs.2018.07.017.  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Nakamagoe K, Yanagiha H, Miyake Z, Kondo Y, Hiyama T, Ishii A, Kaji Y, Oshika T, Sumida T, Tamaoka A.                  | 4. 巻<br>57              |
| 2. 論文標題<br>Monocular Oculomotor Nerve Disorder Manifesting as Cranial Neuropathy in Systemic Lupus Erythematosus: A Case Report. | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Intern Med.  | 6. 最初と最後の頁<br>3445-3449 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2169/internalmedicine.1106-18.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>守屋友貴，加治優一，大鹿哲郎                            |
| 2. 発表標題<br>培養ヒト線維柱帯細胞においてRipasudil により発現されるRNAの網羅的解析 |
| 3. 学会等名<br>第124回日本眼科学会総会                             |
| 4. 発表年<br>2020年                                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平岡玲亜, Kseniya D. Palchunova, 加治優一, 大鹿哲郎 |
| 2. 発表標題<br>ベータ受容体遮断薬(チモロール)の線維柱帯細胞に対する作用の網羅的解析     |
| 3. 学会等名<br>第124回日本眼科学会総会                           |
| 4. 発表年<br>2020年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木住野源一郎, 加治優一, 菊地 千一郎, 小沢忠彦, 高橋秀徳, 井上裕治, 大鹿哲郎, 川島秀俊 |
| 2. 発表標題<br>光トポグラフィを用いた白内障手術前後の脳血流評価                           |
| 3. 学会等名<br>第124回日本眼科学会総会                                      |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>加治優一, 加納英明, 秋山敏宏, 猪子誠人, 瀬川尋貴, 大鹿哲郎 |
| 2. 発表標題<br>非線形ラマン光学を用いた網膜の分子イメージング装置の原理と開発の現状 |
| 3. 学会等名<br>第122回 日本眼科学会総会(招待講演)               |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>加治優一, Johnathan Moore, Tara Moore, 藤田亜佳里, 大鹿哲郎 |
| 2. 発表標題<br>ドライアイ患者の涙液浸透圧上昇と角膜上皮細胞への影響の分子機序の解明             |
| 3. 学会等名<br>第72回日本臨床眼科学会                                   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|                      |
|----------------------|
| 1. 発表者名<br>加治優一      |
| 2. 発表標題<br>眼感染症診療の展望 |
| 3. 学会等名<br>アイフォーラム水戸 |
| 4. 発表年<br>2019年      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>福田理英子, 加治優一, 長谷川優美, 大鹿哲郎                               |
| 2. 発表標題<br>Realtime Multiplex PCRを用いて迅速な診断が可能となったサイトメガロウイルス網膜炎の一例 |
| 3. 学会等名<br>第40回茨城医学会眼科分科会兼茨城県眼科医会集談会                              |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>加治優一               |
| 2. 発表標題<br>塗抹検鏡をはじめめるためには     |
| 3. 学会等名<br>第1回旭川塗抹検鏡講習会(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年               |

〔図書〕 計1件

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>加治優一                 | 4. 発行年<br>2020年 |
| 2. 出版社<br>エムシー出版               | 5. 総ページ数<br>379 |
| 3. 書名<br>グリケーションの制御とメイラード反応の利用 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

加治優一  
[http://www.tsukubadaiganka.com/staff\\_detail/id=75](http://www.tsukubadaiganka.com/staff_detail/id=75)

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|