

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16539

研究課題名（和文）ラマン分光法を用いた腸管虚血に対するバイアビリティ診断方法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a Viability Diagnostic Method for Intestinal Ischemia Using Raman Spectroscopy

研究代表者

室野井 智博（MURONOI, TOMOHIRO）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：70790997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ラマン分光法は、ラマン散乱光が分子構造に固有であることを利用して得られるラマンスペクトルを用いて物質の分子構造を決定する技術である。腸管虚血に対する腸管生存率の迅速かつ適切な判定や腸管虚血範囲の同定は、生命予後や機能予後に大きく寄与する。われわれは、腸虚血モデルラットにおいて、腸虚血細胞に特異的なラマンスペクトルを同定することにより、ラマン分光法を用いて虚血腸管とその生存率を非侵襲的に同定できるのではないかと考えた。虚血ラットの腸管は、非虚血ラットの腸管と比較しAmideIIIと一致するラマンスペクトラムの発生に差があることが示された。ヘリックス構造の割合が高く、タンパク質組成の変化を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマン分光法は特別な前処理を必要とせず、光のみを用いることで低侵襲かつ無標識で生体組織判断が可能である。本研究において、初めて、ラット虚血腸管におけるラマンスペクトラムの候補となる特徴的なスペクトラムを発見した。AmideIIIに代表されるタンパク質変化が虚血腸管の特異的なラマンスペクトラムであることが示されることで、さらに、ヒトの虚血腸管をin situにおいて診断することが可能となる。本研究により、腸管虚血症に対するラマン分光法を用いた新たな診断方法を確立することで、患者の生命および機能的予後の向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Raman spectroscopy is a technique to determine the molecular structure of a substance using Raman spectra obtained by taking advantage of the fact that Raman scattered light is intrinsic to the molecular structure. Rapid and appropriate determination of intestinal viability and identification of the extent of intestinal ischemia for intestinal ischemia greatly contribute to the prognosis of life and function. We hypothesized that Raman spectroscopy can be used to noninvasively identify ischemic intestinal tracts and their viability in a rat model of intestinal ischemia by identifying Raman spectra specific to intestinal ischemic cells. The intestinal tract of ischemic rats showed an altered protein composition with a higher percentage of  $\alpha$ -helix structures compared to the intestinal tract of non-ischemic rats.

研究分野：腸管虚血

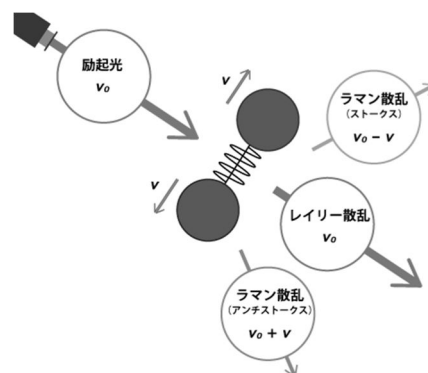
キーワード：ラマン分光法 腸管虚血

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

腸管虚血症は腸管血流が阻害された状態であり、虚血性腸炎、急性および慢性腸間膜動脈閉塞症や非閉塞性腸管虚血症を引き起こす<sup>1</sup>。また、絞扼性腸閉塞やヘルニア嵌頓などの機械的腸閉塞においても腸管虚血症を発症する。本症はその治療時期を逸すると多臓器不全に陥り、高い確率で死に至る臨床的に極めて重要な病態である<sup>2,3,4,5</sup>。現在、虚血壊死に陥った腸管は外科的に切除を行う以外に治療方法がない<sup>6</sup>。しかし、こうした病態ではしばしば広範囲の腸切除が余儀なくされ短腸症候群に陥る可能性が高く、QOL は著しく損なわれるのみならず、長期生命予後をも悪化させる。腸管虚血症に対する、迅速かつ適切な虚血診断および虚血範囲の同定は生命および機能予後に大きく寄与するが、腸管の viability を *in situ* において測定する方法はこれまで確立されていない。従って、切除範囲の最終的な決定は外科医の経験に基づいて行われており<sup>7</sup>、客観的な指標を含めた新たな診断技術の確立が望まれている。

近年、光学技術の急速な発展により、ラマン分光法を生体機能解析に利用する試みが始まっている<sup>8,9,10,11</sup>。光が物質に入射して分子と衝突すると、その一部は散乱される。この散乱光の波長の大部分は、入射光と同じ波長であるレイリー散乱光であるが、わずかに入射角と振動数の異なる散乱光が観察され、これがラマン散乱光である。ラマン散乱光は物質の分子構造に固有であることが知られており、これを利用して得られたラマンスペクトラムを用いることで、物質の分子構造や結晶構造を知る手法がラマン分光法とよばれるものである。ラマン分光法は特別な前処理を必要とせず、光を照射するのみで低侵襲でかつ無標識で生体組織判断が可能でありことから、ラマン分光法を用いた様々な診断技術の発展が期待されている。



本研究申請者らは、ラマン分光法を用いた *in situ* において非侵襲的に虚血腸管の同定とその viability の把握を目的とし、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

虚血に陥った細胞は、正常細胞と異なる特有のラマンスペクトルを呈することが知られているが、腸管虚血細胞特有のラマンスペクトルは現在までに明らかになっていない。

本研究申請者らはラットを用いて、腸管虚血モデルを作成し、

**第1にラマン分光法を用いて腸管の虚血に陥った細胞固有のラマンスペクトルを同定すること**

**第2にヒトにおいて、ラットで同定した虚血腸管特有のラマンスペクトルを捕らえること**

**第3に *in situ* においてラマンスペクトルを用いて虚血腸管を診断すること**

を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ラマン分光法を用いてラットにおける腸管虚血細胞固有のラマンスペクトルの同定.

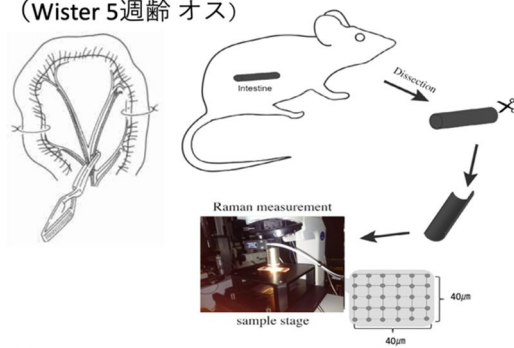
ラットを用いた腸管虚血モデルを作成し、腸管虚血組織（小腸粘膜，固有筋層組織）と正常組織を採取し、ラマン散乱光観測装置で観察して、ラマンスペクトルの差から腸管虚血細胞特有のラマンスペクトルを同定する。具体的には、虚血細胞においては、還元型シトクロム，ヘモグロビン，ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドなどのラマンスペクトラムなどが変化していることが報告されており、候補となるラマンスペクトラムを検索し、腸管虚血細胞の同定に有用かを判定し、ラットで同定した腸管虚血細胞固有のラマンスペクトルをヒトで同定できることの検証を行う

### 4. 研究成果

Wister5 週齢ラットを用いて、開腹し 30 分動静脈を結紮し、腸管虚血モデルを作成した。虚血腸管を摘出し、処理を加えず、内腔を表となるように切開し、785nm 励起ラマン分光器にて測定を行った。

腸管の顕微ラマンでの測定はいままで報告がなく、腸管での測定が可能かどうかを検討した。

図 1 ラット腸管虚血モデル  
(Wister 5 週齢 オス)

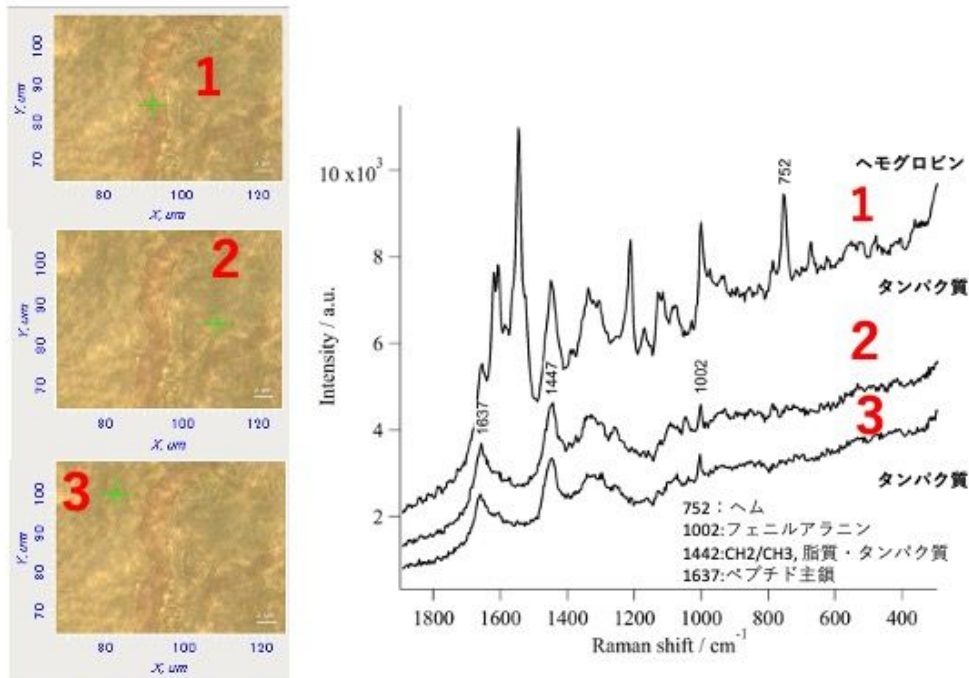


### 結果

図 2 の 1 で示している毛細血管部分を測定するとヘモグロビンに特有のラマンスペクトラムを示しました。ヘモグロビンであることは、752 はポルフィリン環の呼吸振動に由来するラマンスペクトラムであり、ヘムに特徴的なラマンスペクトラムが出現していることから同定可能です。

同様に、2 および 3 を測定しますと、タンパク質を示すラマンスペクトラムが出現しており、これらから、ラマン分光法による腸管測定が可能であることを示しました。

図 2



## 結果

図 3 右側がラットから腸管を取り出した直後に測定したラマンスペクトラムであり、 $0.4 \mu\text{m}$  四方を 25 ポイント測定した平均値を検出した。

左側が、30 分腸管虚血モデルから腸管を測定したラマンスペクトラムであり、同様に 25 ポイント測定した平均値であるが、いずれもタンパク質を多く含むラマンスペクトラムを示している。

図 4 において、非虚血腸管のラマンスペクトラムと虚血腸管のラマンスペクトラムを比較において、重ねて比較を行うと虚血腸管と非虚血腸管のラマンスペクトラムは相似しているが、 $1200\text{-}1500$  のラマンシフト帯に、相違を認めた。このシフト帯のラマンスペクトラムは Amid III に特徴的なラマンスペクトラムであることが知られており、Amid III と一致するラマンスペクトラムの発生に差があることが示された。Amid III とは、タンパク質を構成するアミノ酸のペプチド結合を構成する C-N 結合の伸縮振動および N-H 結合の変角振動を反映するラマンスペクトラムであり、タンパク質の 2 次構造である、 $\alpha$ -Helix 構造と  $\beta$ -sheet 構造では、ラマンスペクトラムのピークが異なることが知られており、 $\alpha$ -Helix 構造では  $1300\text{-}1265$  側、 $\beta$ -sheet 構造では  $1230\text{-}1240$  側にスペクトラムが発生することが知られている。

虚血ラットの腸管では非虚血のラットの腸管と比較して、 $\alpha$ -ヘリックス構造の割合が高いタンパク質の構成が変化することが示された。

図 3

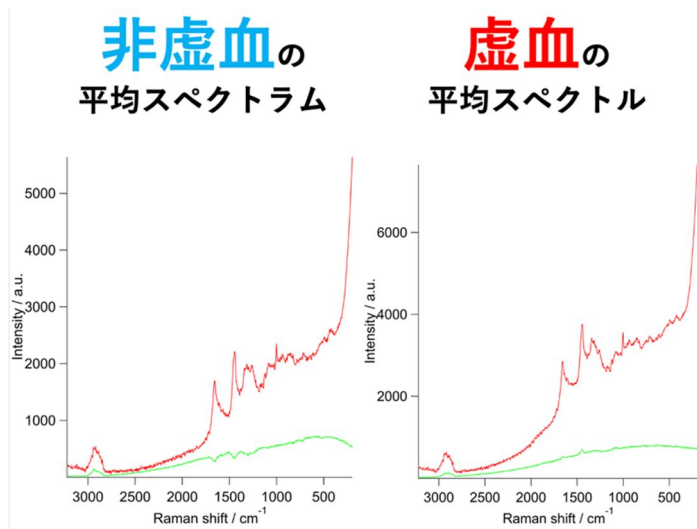
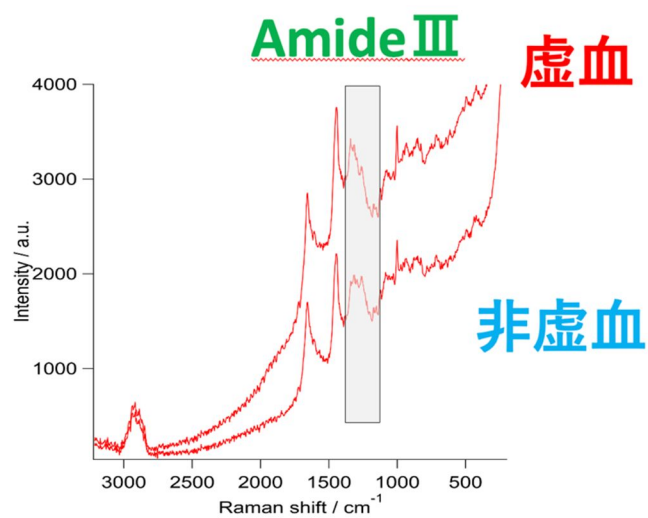


図 4



しかし、虚血腸管及び非虚血腸管において、タンパク質の構成を変化している主要因はなにかについては、更なる検討が必要であり、病理学的、免疫学的な検討を続けているところであり、人への臨床応用にむけて、基礎研究を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 室野井智博
2. 発表標題 ラットを用いた腸管虚血モデルにおけるラマン分光法による腸管虚血の同定
3. 学会等名 第55回日本腹部救急学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥根大学 医・生物ラマンプロジェクトセンター <a href="https://fvraman.wixsite.com/raman">https://fvraman.wixsite.com/raman</a>
---

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------