

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15315

研究課題名（和文）インテリジェントバイオラマン解析基盤の開発

研究課題名（英文）Development of an intelligent bio-Raman analysis approach

研究代表者

安田 充（Yasuda, Mitsuru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：20742307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高速なラマンスペクトル測定技術を開発するため、Ag基板上に透明なAl₂O₃超薄膜を形成したナノ薄膜干渉基板を作製した。ナノ薄膜干渉基板では励起光の強い散乱によってラマン散乱光が増強することが示唆された。そこで、高いラマン増強をもたらすナノ薄膜干渉基板をヒト培養細胞のラマンスペクトル測定に応用した。その結果、ナノ薄膜干渉基板では一般的なガラス基板と比較し、非常に強いラマン散乱光が観測された。この結果から、測定時間を短縮できる高速ラマンスペクトル測定技術を開発することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞のラマンスペクトル測定は、極めて微弱なラマン散乱光が原因で、非常に長い時間を要することが問題となっていた。そのようななか、本研究ではナノ薄膜干渉基板により、ヒト培養細胞からのラマンシグナルを増強したことで、高速ラマンスペクトル測定が可能な技術を開発した。本技術は、短い時間で起きる生化学反応の追跡のみならず、生体分子の高感度な検出を可能にすることから、生物医学研究のさらなる発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a high-speed Raman spectrum measurement technique, we fabricated an optical interference mirror (OIM) slide consisting of a transparent Al₂O₃ ultrathin film on an Ag slide. It was suggested that the Raman scattering light with the OIM slide is enhanced by the strong scattering of the excitation light. Therefore, when the OIM slide providing the high Raman enhancement was applied to Raman spectrum measurement of cultured human cells, a very strong Raman signal was observed with the OIM slide compared to a common glass slide. Thus, we were able to develop a high-speed Raman spectrum measurement technique that can shorten the measurement time.

研究分野：分析化学

キーワード：ラマン分光 光学干渉 スペクトル

1. 研究開始当初の背景

近年、非染色・非破壊で細胞内分子の分子構造情報をもたらすラマン分光法が、未知の生命現象の探索に適した次世代バイオイメージング技術として注目を集めている。しかし、細胞にダメージを与えない低出力レーザーでデータ解析に必要なある程度の Signal-to-Noise (S/N) 比をもつラマンスペクトルを得るには、1 ラマンスペクトルあたり少なくとも 1 秒以上のレーザー露光時間を要する。この長い露光時間が原因で、短い時間に起きる生命現象を時間分解して追跡できない問題があった。

この問題を解決するため、本研究では Ag 基板上に透明な Al_2O_3 超薄膜を形成したナノ薄膜干渉基板に着目した。ナノ薄膜干渉基板では一般的なガラス基板と比較し、蛍光分子からの蛍光が 100 倍以上増強する。この高い増強は、主に Al_2O_3 超薄膜による励起光の光学干渉と蛍光の光学干渉の二重の効果によって起きる。光学干渉によって蛍光が増強するという事は、ラマン散乱光も光学干渉によって増強することが予想される。事実、初期研究ではラマン散乱光の増強が確認された。ナノ薄膜干渉基板によってラマン散乱光を増強できれば、短時間で起きる生命現象を時間分解して追跡できるようになり、既存の問題を解決できる。

一方、ラマン実験では、様々な細胞内分子からのラマン散乱光が重なり合ったスペクトルから生物学的に意味のある情報を抽出するために、通常、多変量解析が利用される。しかし、データ解析に数時間から数日という膨大な時間と労力を要することが問題となっている。最も時間を要するデータ解析工程が研究効率を左右することから、高速ラマンスペクトル技術と併せて、高速データ解析基盤も開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ薄膜干渉基板によりラマン散乱光を増強することで、様々な生命現象を時間分解して分子レベルで追跡できる新たな高速ラマンスペクトル測定法を開発するとともに、バイオリマン実験の律速となっていた膨大なラマンデータの解析時間を短縮できる高速ラマンデータ解析基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

スパッタリング法によりガラス基板上に 500 nm の Ag、その上に 0~450 nm までいずれかの膜厚をもつ Al_2O_3 超薄膜を形成することで様々な膜厚のナノ薄膜干渉基板を作製した。ナノ薄膜干渉基板でラマン散乱光が増強するメカニズムを調べるため、作製したナノ薄膜干渉基板上に様々な波長の励起光を入射し、基板表面で反射した励起光を検出した。得られた結果を基に、最大ラマン増強をもたらす 1 つの最適な Al_2O_3 膜厚を決定した。

決定した Al_2O_3 膜厚をもつナノ薄膜干渉基板を、ヒト培養細胞のラマンスペクトル測定に応用した。細胞試料としてはヒト由来の表皮角化細胞 HaCaT と子宮頸癌細胞 HeLa を使用した。これらの細胞を DMEM で数日間培養し、PBS で置換後、ナノ薄膜干渉基板と比較用ガラス基板上でラマンスペクトルを測定した。

4. 研究成果

ナノ薄膜干渉基板上に様々な波長の励起光を入射したとき、基板表面で反射した励起光の強度は Al_2O_3 膜厚の増加に伴って周期的に変動した。周期的な変動は入射した励起光の波長が長くなるにつれ、その周期が長くなった。この傾向を確認するため、フレネルの公式を用いた反射率の理論シミュレーションを行った。その結果、実験結果と非常に良好な一致を示した。

一方、過去の成果では、励起光の反射光強度が低い Al_2O_3 膜厚付近では、蛍光の高い増強とともに励起光の強い散乱光が観測されており、この強い散乱効果が蛍光増強に大きく寄与していることが示唆されている。蛍光が増強する Al_2O_3 膜厚付近ではラマン散乱光の増強も確認されていることから、ナノ薄膜干渉基板でのラマン増強は、基板表面での励起光の強い散乱効果によって起きることが示唆された。

以上の結果に基づき、最大ラマン増強をもたらす最適な Al_2O_3 膜厚を決定した。励起光の反射光強度が最も低い、すなわち励起光の散乱強度が最も高い Al_2O_3 膜厚は 100 nm 付近である。この Al_2O_3 膜厚付近では高いラマン増強が得られることから、およそ 100 nm 程度が最適な Al_2O_3 膜厚であると決定した。

100 nm 程度の Al_2O_3 膜厚をもつナノ薄膜干渉基板でヒト培養細胞からのラマンスペクトルを測定した。ナノ薄膜干渉基板ではガラス基板と比較し、HaCaT 細胞から非常に強いラマンシグナルが観測された。同様の強いラマンシグナルが HeLa 細胞でも観測された。これにより、ラマンスペクトルの測定に要する時間を短縮でき、これまで時間分解して追跡できなかった短い時間で起きる生命現象を、高速なラマンスペクトル測定によって追跡可能になることが示唆された。以上より、本研究で得られた成果は、将来的な生物医学分野のさらなる発展に貢献することが期待される。

一方、高速ラマンデータ解析基盤の開発についても取り組んだ。本研究では、膨大なラマンスペクトルデータセットを、そのデータセットを構成する主要な成分のスペクトル情報と各成分の空間分布情報に分解できる、多変量解析の一種である多変量波形分解-交互最小二乗法 (Multivariate curve resolution-alternating least squares : MCR-ALS) を使用した。高速 MCR-ALS プログラムを構築するため、ワークステーションを導入した。現在、そのプログラムを構築中である。今後は、高速 MCR-ALS プログラムを完成させ、膨大なラマンデータの解析に要する時間を短縮することで、研究の効率をさらに向上させる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yasuda Mitsuru, Takeshita Norio, Shigeto Shinsuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Deuterium-labeled Raman tracking of glucose accumulation and protein metabolic dynamics in <i>Aspergillus nidulans</i> hyphal tips	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80270-9	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------