

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670089

研究課題名(和文)非線型ラマン分光法による生体組織内における薬剤分子局在の可視化

研究課題名(英文)Direct label-free measurement of the distribution of small molecular weight compound inside thick biological tissue using coherent Raman microspectroscopy

研究代表者

川岸 将彦(Kawagishi, Masahiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60323606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：分子量が300 kDa以下の低分子化合物の、生物組織中での局在分布は、適切な測定方法がないため、あまり良く調べられていない。この研究ではCARS(コヒーレント反ストークスラマン散乱)分光法を用いて、低分子化合物を非標識で検出同定する事を試みた。この測定法による低分子化合物の検出のモデル実験として、タウリン溶液に浸漬したマウス角膜を測定したところ、角膜内部において、タウリンに相当するラマンピークを検出できて、また、深さによる濃度分布も測定する事ができた。このCARS分光法による測定は、低分子化合物を、非標識で、湿潤なままの組織で、分布を可視化する方法として、有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Distributions of small molecular weight (less than 300 kDa) compounds inside biological tissue have been obscure because of the lack of appropriate methods to measure them. We used CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) spectroscopy to detect and identify a label-free small molecule compound. To facilitate detection in aqueous environment, we utilised time-resolved and phase-sensitive techniques to reduce non-resonant background generated from water. We applied this technique to detect small molecular weight compound, taurine, inside mouse cornea tissue immersed in taurine solution as an initial model experiment. We detected a Raman peak of taurine near wavenumber 1033 cm^{-1} inside cornea and successfully characterised its depth profile in the tissue. Our CARS spectra measurement can be a promising method to measure and visualise the distribution of small bio-related compounds in biological background without using any labeling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：非線型ラマン分光 CARS 顕微鏡技術 解剖学

1. 研究開始当初の背景

小分子化合物(分子量数百)の局在を可視化する方法は知られていない。蛋白などの大きな生体分子では蛍光標識の技術が使えるが、低分子化合物では、標識と同程度の大きさのため、標識を使いにくいからである。しかし、薬理学的作用を有する物質で、この程度の大きさのものは多い。

分子固有の構造・振動によって光の波長が変化するラマン効果は、分子固有のパターンを示す。これを観測するラマン分光は、蛍光などの標識を使わずに、小分子の分布情報を得る為の方法になり得る。

ラマン効果の信号は、そのままでは弱いので、増強する為に、非線型コヒーレントラマン分光という手法が用いられ、代表的な例として、SRS(Stimulated Raman Spectroscopy)法、CARS(Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy)法などがある。

SRS法は、レーザー光による誘導によって強いラマン効果を起こす分光法であり、CARS法に比べて光学系が簡単であり、これを用いた顕微鏡観測の例が報告されている(文献1-3)。しかしSRSでは、多種類の分子(つまり多くのラマン効果パターン)の観測をしようとすると、光学系が簡単でなくなる弱点がある。

一方、CARS法は、ラマン信号を共鳴によって増強する分光法であり、SRSと同程度の感度を示す。CARS法を用いた、生体組織での顕微鏡観測には先行例がある(文献4)が、湿潤な試料では共鳴によるノイズが大きく、光学系が複雑で、それ以上の応用が難しかった。

連携研究者の三沢和彦、鈴木隆行は、CARSの光学系の問題や、共鳴ノイズからの信号分離の問題を改善した、位相制御コヒーレントラマン顕微分光法の開発に成功している(文献5,6)。この研究課題は、この連携研究者と共同でその生体組織観察への応用を企図している。

<引用文献>

- (1) Ploetz et al. (2007) Applied Physics B. 87, 389-393.
- (2) Saar et al. (2010) Science. 330, 1368-1370.
- (3) Saar et al. (2011) Mol Pharm. 8, 969-975.
- (4) Evans et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA. 102, 16807-16812.
- (5) Nagashima et al. (2011) J Chem Phys. 134, 024525.
- (6) Suzuki et al. (2011) Opt Express. 19, 11463-70.

2. 研究の目的

本研究課題は、ラマン分光の、生体組織観察へ

の応用を目的とする。連携開発者が開発した位相制御コヒーレントラマン顕微分光法を応用する。

(1) CARS顕微鏡の利点である、色々な信号パターンを持つ分子を観察出来るという特性を生かし、生体環境の中で、多種の低分子、生理活性分子のラマン信号を測定してみ、どのような低分子化合物が、このラマン分光での観測に適しているかを screening する。

(2) そして、位相制御コヒーレントラマン顕微分光法を利用した顕微鏡を使い、湿潤な生物組織内における薬剤分子や生体活性分子の分布を可視化する事を目的とする。

CARSは従来、約4000 - 1500 cm^{-1} の高波数領域で、2原子間の結合の振動を調べるのに使われる事が多かった。この領域での信号は強く、生物領域では、脂質の分布や組成を見る事などに使われるが、生体分子では、原子間の結合の種類に限られるため、細かい分子種の区別は困難であった。一方、 $< 1500 \text{ cm}^{-1}$ の指紋領域は、信号強度は低いが、分子の折れ曲りなど、多原子の関わる振動の信号が見られ、分子に特有のパターンを示す事が多い。これは分子種の区別に使える可能性があるが、しかし、この波数領域では、水分子が強い非共鳴ノイズを出すため、水を多く含む生物組織での観察は出来ていなかった。湿潤な組織の中で、この非共鳴ノイズを除去して、観察対象の化合物に特有な共鳴CARS信号を観測する事が目標である。

3. 研究の方法

(1) 位相制御コヒーレントラマン顕微分光法を用いた、生物組織内でのCARS信号の観察に適した分子の探索。日本薬局方に収載されている化学薬品リストなどを参考にし、文献やデータベースなどでラマンスペクトルの報告があるものは、それを調べて、候補分子を選んだ。候補分子のうち、代表的なものは、連携研究者の位相制御コヒーレントラマン顕微鏡のプロトタイプ機を用いて測定し、スペクトルのパターンや信号の強度を調べた。また、選んだ化学物質を、複数の組織に投与して、その中で検出の様子を調べた。

(2) 以上の探索により、生物組織内での薬剤の測定モデルケースとして、マウスより採取した角膜組織を、タウリン溶液に浸漬し、その標本の測定を行った。これを用いて、組織内でのタウリンの濃度分布の測定を試みた。

CARS観測に付随して生じる非共鳴ノイズ信号を減らして、共鳴CARS信号を抽出するために、位相敏感法(物質特有の共鳴CARS信号は、入射光の位相に応じて強弱が変化するが、非共鳴ノイズ信号は変化しない。これを利用して、位相変化に同調する成分を抽出するもの)、時間分解法(非共鳴ノイズ信号は、3波長の入射光

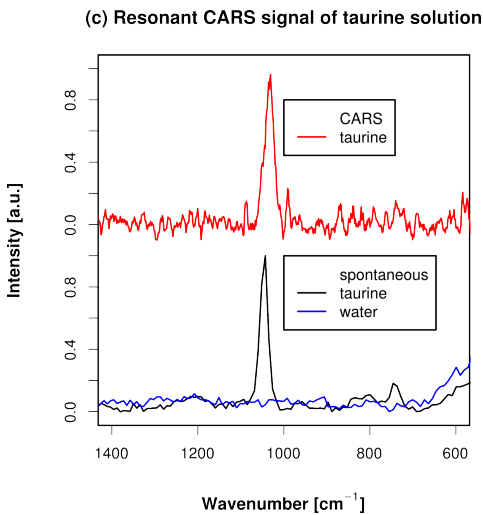
が同時に入射した時のみ生じるが、共鳴 CARS 信号は、共鳴を起こした分子の振動の寿命の範囲内なら、3 波長のうちのプローブと呼ばれる光をずらしても発生する。これを利用して、共鳴信号の信号雑音比を改善するもの)の原理を組み合わせた光学系を組んだ。

4 . 研究成果

(1) 多くの化合物で、CARS 信号を取得する事が出来たが、現行のプロトタイプ機は、波数 500 - 1500 cm^{-1} の指紋領域の信号の測定に向くように設計しており、その範囲で強めのラマン信号を示すのは、比較的分子量の化合物が多かった。

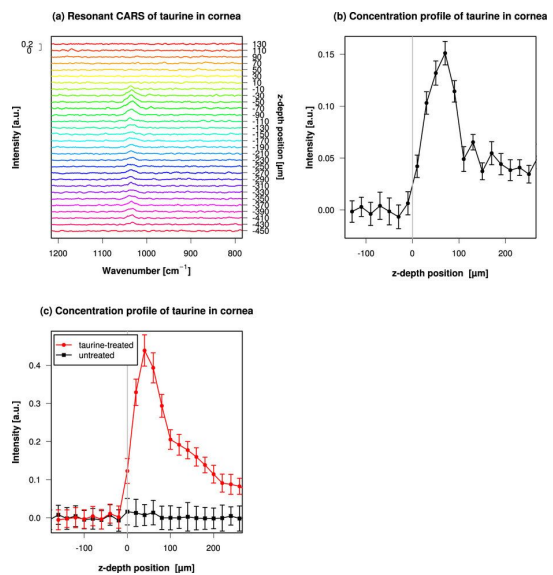
CARS は 3 光子過程であり、そのために、励起光の組織による散乱が信号強度やノイズに大きな影響を与える事が分かった。よって、比較的透明度の高い角膜組織や、薄切した組織が観察に向く事が分かった。

(2) タウリンの CARS 信号の測定を行うと、水溶液中で、波数 1033 cm^{-1} の信号を観測でき、濃度は 6 - 10 mM 程度まで検出できた。



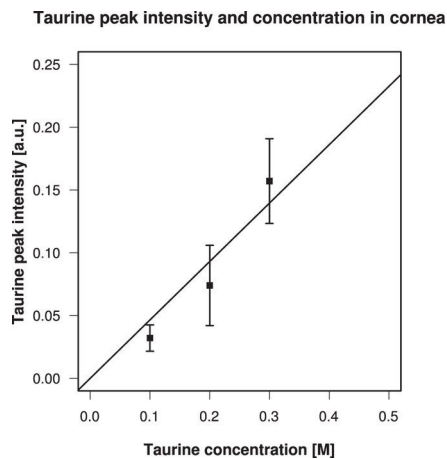
(図 1: CARS(上)測定により、タウリンの波数 1033 cm^{-1} のピークが観測できた。下は従来の自発ラマンによる測定例。)

このタウリン溶液に浸漬した角膜組織から、CARS 測定をしてみると、角膜の内部からタウリンの波数 1033 cm^{-1} 信号を検出できた。CARS は多光子過程であるため、従来のラマン散乱を用いた顕微鏡よりも、縦横および深さ方向に高い空間解像度を持つので、それを利用して、z 軸(光軸)方向の濃度プロファイルも測定する事が出来た。



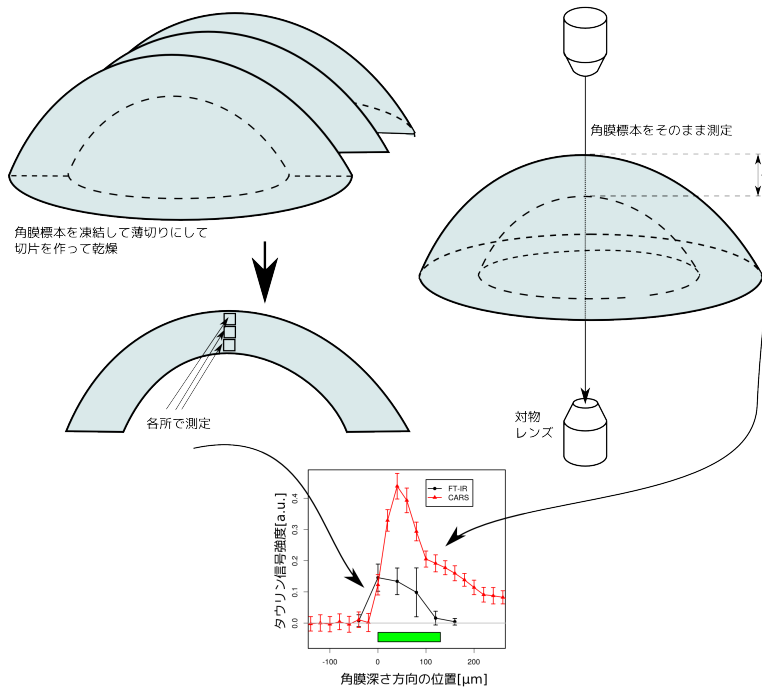
(図 2: (左上) タウリンに浸漬した角膜の中央部での CARS 信号の観測。中央部の厚みの中を、観測の焦点の位置を動かしながら測定。位置により、1033 cm^{-1} のピークの強度が変化する様子が見える。(右上) 左上の測定での、ピーク強度の変化を角膜の厚み方向の位置に対して表示したもの。(左下) 右上と同様の、他の試料での測定例。)

観測領域での物質濃度と、得られた信号強度とは、一定の組織環境(光の吸収散乱の程度などに関して)のもとであれば、組織の内部での測定に於いても、ほぼ比例する事を確認出来た。



(図 3: 異なる濃度のタウリン溶液に浸漬した角膜組織内からの、タウリンの CARS 信号の強度。濃度と信号強度はほぼ比例する。)

CARS 顕微鏡は、新しい測定技術なので、従来の従来の定量法との比較も必要である。そこで、凍結、薄切、乾燥した角膜試料で、フーリエ変換赤外分光(FT-IR)顕微鏡を用いてタウリンを定量し、それを CARS 測定と比較してみた。その結果、CARS 顕微鏡と FT-IR 顕微鏡とで、ほぼ同様の濃度プロファイルを得られた。



(図4: CARSによる位相制御コヒーレントラマン顕微分光法(右上)では、z軸(光軸)方向での解像度が高いので、角膜のなかでの観測焦点の位置を動かすだけで、濃度分布を測定する事が出来た(下図赤線)。一方、従来の赤外分光法で、これと同様の測定をするには(左上)、角膜を薄切、乾燥しなければならなかった(下図黒線)。)

CARS法はFT-IR法と同等に、生物組織内で、非標識の小分子化合物の濃度の分布を測定するのに使える事が確認できた。FT-IR法では組織の薄切、乾燥が必要だったのに対し(赤外線を使うFT-IR法では、特にz軸方向の解像度が低く、また、赤外は水に吸収されるため)、CARSでは湿潤なままの試料を、薄切せずにそのまま観察する事が出来た。この特徴は、将来的に生きた組織内での小分子の分布を測定する上で、有用であると考えられた。

今回の研究では、外部から過剰量に投与した低分子化合物の濃度分布の測定を行ったが、今後は、更に測定感度を上げて、組織に存在する様々な化合物の中で、特定の物質をどこまで少ない量で検出出来るかを探る事が課題になる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) Masahiko Kawagishi, Yuki Obara, Takayuki Suzuki, Masumi Hayashi, Kazuhiko Misawa & Sumio Terada. Direct label-free measurement of the distribution of small molecular weight compound inside thick biological tissue using coherent Raman microspectroscopy. Scientific Reports, Vol. 5, 13868 (2015) 査読有。

doi:10.1038/srep13868

〔学会発表〕(計5件)

- (1) Masahiko Kawagishi, Yuki Obara, Takayuki Suzuki, Masumi Hayashi, Kazuhiko Misawa, Sumio Terada. Direct Label-Free Measurement of the Distribution of Small Molecular Weight Compound Inside Thick Biological Tissue Using Coherent Raman Microspectroscopy. The 2nd East-Asia Microscopy Conference, 2015-11-25 「姫路商工会議所本館(兵庫県・姫路市)」
- (2) Masahiko Kawagishi, Yuki Obara, Takayuki Suzuki, Masumi Hayashi, Kazuhiko Misawa, Sumio Terada. Measuring the distribution of small molecule compounds inside biological tissue via intrinsic molecular vibrations using nonlinear Raman spectroscopy. 第38回日本神経科学大会, 2015-07-29, 「神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)」
- (3) Kawagishi, Masahiko; Obara, Yuki; Suzuki, Takayuki; Hayashi, Masumi; Misawa, Kazuhiko; Terada, Sumio. Measuring the distribution of small molecule compounds inside biological tissue via intrinsic molecular vibrations using nonlinear Raman spectroscopy. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015-03-23, 招待口演, 「神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)」
- (4) Masahiko Kawagishi, Yuki Obara, Takayuki Suzuki, Masumi Hayashi, Kazuhiko Misawa, Sumio Terada. MEASURING THE DISTRIBUTION OF TAURINE MOLECULE INSIDE BIOLOGICAL TISSUE VIA INTRINSIC MOLECULAR VIBRATIONS USING NONLINEAR RAMAN SPECTROSCOPY. Biophysical Society 59th Annual Meeting, 2015-02-11 「ボルチモア(米国)」
- (5) Masahiko Kawagishi, Yuki Obara, Takayuki Suzuki, Masumi Hayashi, Kazuhiko Misawa, Sumio Terada. Measuring the distribution of taurine molecule inside biological tissue via intrinsic molecular vibrations using nonlinear Raman spectroscopy. 2014 ASCB / IFCB Meeting, 2014-12-07 「フィラデルフィア(米国)」

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学プレスリリース

<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20150911.pdf>

東京農工大学プレスリリース

<http://www.tuat.ac.jp/disclosure/pressrelease/20150409130023/20150911/index.html>

<http://www.tuat.ac.jp/disclosure/pressrelease/20150409130023/20150911/upimg/20150910134651295362417.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川岸 将彦 (KAWAGISHI, Masahiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60323606

(2) 研究分担者

寺田 純雄 (TERADA, Sumio)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00262022

齊藤 健太

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60374659

(3) 連携研究者

三沢 和彦 (MISAWA, Kazuhiko)

東京農工大学・工学研究院・教授

研究者番号：80251396

鈴木 隆行 (SUZUKI, Takayuki)

明治大学・理工学部・准教授

研究者番号：80539510