

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12519

研究課題名(和文)細胞や組織に適した光増強基板を利用した新規ラマン散乱分光法の開発

研究課題名(英文)Development of a light enhancement plate for Raman spectroscopy

研究代表者

高松 哲郎 (TAKAMATSU, TETSURO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40154900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン散乱分光法は、試料を構成する分子の分子振動に基づき、細胞や組織を非染色的にイメージングできる手法として有用である。しかし、従来のラマン散乱分光法は、ラマン散乱光が非常に微弱であるため測定時間がかかり、かつ分子感度が低いという問題があった。そこで本研究では、光増強基板によるラマン光の増強効果を援用した新規なラマン散乱分光法を開発し、細胞・組織の光増強イメージングを行った。その結果、光増強基板を用いることで生体組織を高い増強度でラマンイメージングできることが明らかとなった。また、神経組織、骨格筋組織、結合組織、脂肪組織などの様々な生体組織を選択的に可視化できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Raman scattering spectroscopy is a promising technique to evaluate cells and tissues without any treatment such as fixation and staining based on molecular vibrations of inherent molecules of samples. However, the conventional Raman spectroscopy is time-consuming and has low molecular sensitivity due to the low efficiency of Raman scattering, disabling sufficient cell and tissue diagnosis. To overcome these issues, we developed a novel Raman spectroscopy with a light enhancement plate involving a plasmonic enhancement effect. We realized enhanced Raman imaging of nerves, muscles, connective tissues, adipose tissues with high enhancement factor. Our approach would be a useful and powerful tool for label-free diagnosis of cells and tissue for biological and medical applications.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：ラマン散乱分光 分子イメージング バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

ラマン分光法は、光を物質に照射した際に散乱されるラマン散乱光を計測する分光法である。ラマン散乱光は、その物質を構成する分子固有の波長をもつ光をいう。つまり、ラマン散乱光を分光することで、細胞や組織の構成分子をラマンスペクトル情報として捉えることができる。したがって、従来は染色しなければ観察することができなかった細胞内分子分布、間質や細胞の状態といった組織情報が、ラマン散乱分光法を用いることにより、非侵襲的に、無標識で生体情報をプローブすることができる可能性を持つ。

研究代表者らは、これまでラマン散乱分光法を用いた心筋梗塞や末梢神経の組織観察法(業績文献: Ogawa et al., BBRC, 2009, Minamikawa et al., HCB, 2013)を開発し、非標識的な組織の分子イメージングを実現してきた。

しかし、ラマン散乱光が非常に微弱であるため、従来の手法ではイメージングに非常に時間を要していた(数十分~数時間)。そのため、ラマン散乱分光法は、数十分オーダー以上での準静的分子ダイナミクスイメージングには有用であったが、動的な分子ダイナミクス、あるいは多数の組織の網羅的解析には、測定時間の問題が伴っていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の微弱なラマン散乱光を増幅可能な光増強基板を用いた新しいラマンイメージング法を開発し、ラマン散乱分光法に基づく高速・高感度分子イメージングを実現する。

### 3. 研究の方法

本研究では、特に下記の2点を行った。

- (1) 光増強基板を用いたラマンスペクトルの基礎スペクトルデータベースの作成と光増強基板を用いた際のラマン散乱分子の同定
- (2) 増強ラマンスペクトルから組織内分子を解析する解析アルゴリズムの開発と組織診断への展開

### 4. 研究成果

(1) 光増強基板を用いたラマンスペクトルの基礎スペクトルデータベースの作成と光増強基板を用いた際のラマン散乱分子の同定

まず、光増強基板を用いたラマンスペクトルの基礎スペクトルデータベースの作成を行った。本研究で用いた光増強基板は、電子の集団振動であるプラズモンを援用した光増

強を基盤としているため、得られるラマンスペクトルは、通常のラマンスペクトルとは異なることが知られている。その為、光増強基板を用いたラマンスペクトルデータベース作成および散乱分子の同定を行うことで、組織イメージングに適したラマンシグネチャーを探索する。

図1に Rhodamine 6G, Cysteamine, 2-naphthalene thiol, 1-hexadecanethiol の増強ラマンスペクトルを示す。これらの分子は、光増強基板上に  $10^{14}$  分子/cm<sup>2</sup> の密度でスピコートした。この条件下において、通常のガラス基板上では測定できなかったことから、非常に高い増強ラマンスペクトルが得られていることがわかる。この時の増強度は、 $10^2 \sim 10^4$  程度であった。他にも、心筋組織や神経およびその周囲組織の増強ラマンスペクトルを取得し、データベース化した(図2)。

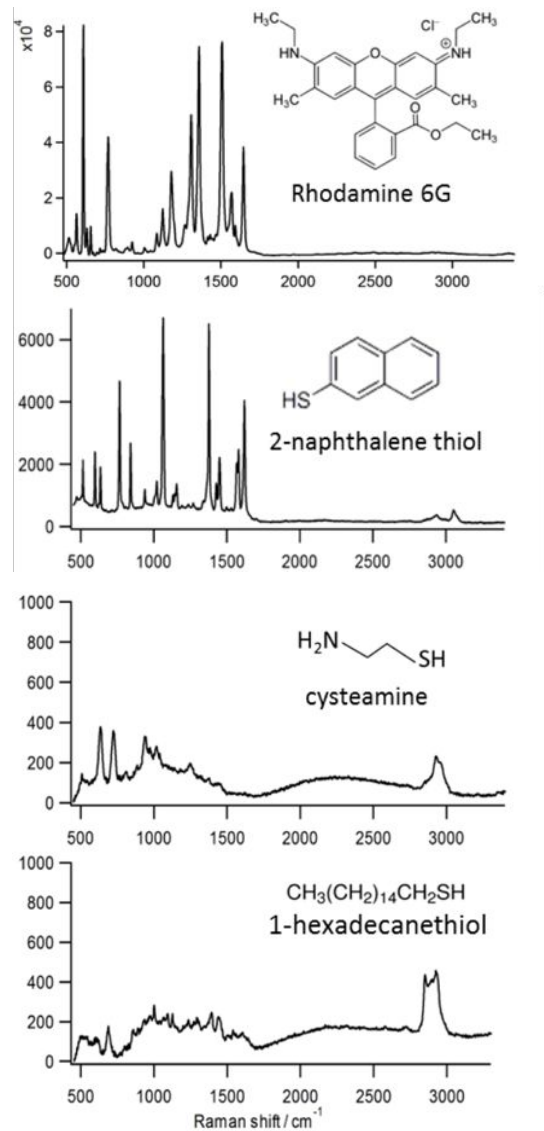


図1. 様々な分子の増強ラマンスペクトル (Rhodamine 6G, Cysteamine, 2-naphthalene thiol, 1-hexadecanethiol)

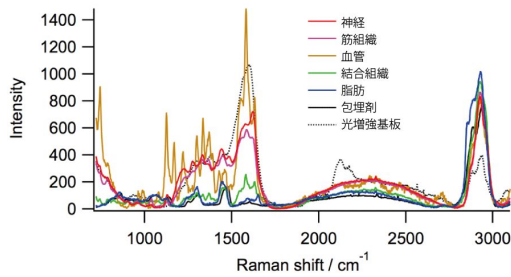


図 2 . 生体組織の増強ラマンスペクトル .

次に、得られたラマンスペクトルから、散乱分子の同定を試みた。Rhodamine 6G や 2-naphthalene thiol の場合、ガラス基板上での測定と同じラマンスペクトルが得られた。このことから、Rhodamine 6G や 2-naphthalene thiol では、通常のラマン散乱と同様の機構により、ラマン散乱が生じていることが推察される。ただし、光増強基板により、その増強度が著しく増強されている。

一方、心筋組織や神経組織の場合、ガラス基板上のラマンスペクトルと大きく異なることも明らかとなった。その際、850, 1592, 1615  $\text{cm}^{-1}$  付近は顕著な増強 ( $>10^2$ ) が見られ、1440, 1650  $\text{cm}^{-1}$  などはそれほど増強されなかった (2~4 倍程度)。このことから、光増強基板を用いることで、必ずしもすべての分子振動が増強されているわけではなく、特定の分子振動が選択的に増強されていることが明らかとなった。なお、得られたラマンスペクトルは各組織に固有であり、ラマンシグネチャーとして利用できることも明らかとなった。

以上のことから、光増強基盤を用いた場合、通常のガラス上のラマンスペクトルとは必ずしも一致しないが、特有のラマンシグネチャーが存在することが明らかとなり、細胞や組織イメージングへ展開可能であることが明らかとなった。

### (2) 増強ラマンスペクトルから組織内分子を解析する解析アルゴリズムの開発と組織診断への展開

次に、増強ラマンスペクトルから組織内分子を選択的に可視化できる解析アルゴリズムの開発を行い、ex vivo 組織診断への応用を行った。今回は、部分最小二乗法による判別分析法の開発を行った。

図 3, 4 に部分最小二乗法による神経組織の増強ラマンスペクトル解析結果を示す。解析には、有髄神経、結合組織、および包埋剤をそれぞれ 1000 点スペクトルデータを取得し実施した。部分最小二乗法を用いることで、各組織の特徴を説明しうる潜在変数プロットを得ることができた (図 3)。この時のスコアプロットの分布 (図 4) から、各組織がクラスター化されている様子がわかる。即ち、部分最小二乗法とその時のスコアを用いる

ことで、各組織を選択的にイメージングすることができることが明らかとなった。

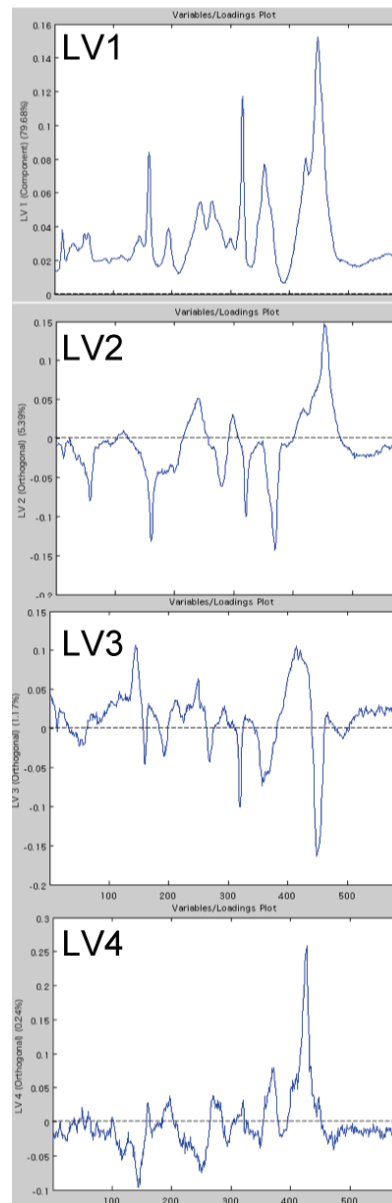


図 3 . 部分最小二乗法による神経組織の増強ラマンスペクトル解析。(潜在変数プロット) .

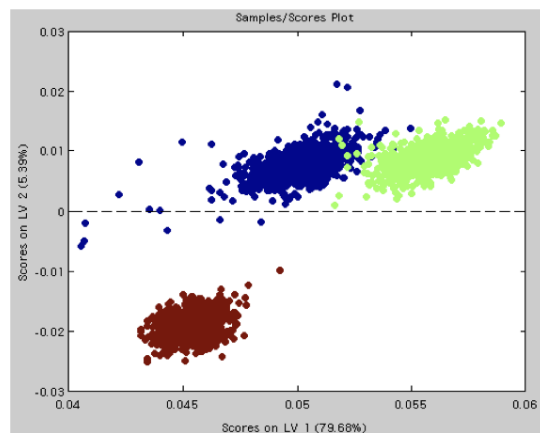


図 4 . 部分最小二乗法による神経組織の増強ラマンスペクトル解析。(スコアプロット) . 青, 神経; 緑, 結合組織; 赤, 包埋剤 .

図5に部分最小二乗法により得られたスコアを用いて神経組織をイメージングした結果を示す。図より明らかなように、神経、結合組織、包埋剤を選択的にイメージングできていることがわかる。

以上のことから、増強ラマンスペクトルから部分最小二乗法を用いることで組織内分子を選択的に解析可能であることが明らかとなった。これにより組織診断への展開の可能性も示された。

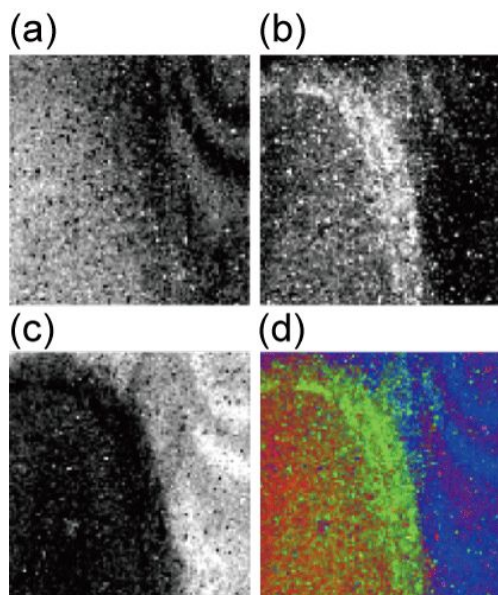


図5. 神経組織の選択的イメージング。(a) 神経, (b) 結合組織, (c) 包埋剤, (d) マージ画像(赤, 神経; 緑, 結合組織; 青, 包埋剤)。

以上のことから、本研究では、従来の微弱なラマン散乱光を増幅可能な光増強基板を用いた新しいラマンイメージング法を開発し、ラマン散乱分光法に基づく高速・高感度分子イメージングを実現した。今後は、本手法を様々な生体組織イメージングへ展開し、新たな組織診断法として確立していく。

#### 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 5 件)

(1) 原著論文(計 3 件)

[03] Ohira, S.; Tanaka, H.; Harada, Y.; Minamikawa, T.; Kumamoto, Y.; Matoba, S.; Yaku, H.; Takamatsu, T. Label-free detection of myocardial ischaemia in the perfused rat heart by spontaneous Raman spectroscopy. Sci. Rep. 7, 1-9 (2017) 査読有。

[02] Kumamoto, Y.; Harada, Y.; Tanaka, H.; Takamatsu, T. Rapid and accurate peripheral nerve imaging by multipoint

Raman Spectroscopy. Sci. Rep. 7, 1-10 (2017) 査読有。

[01] Minamikawa, T.; Harada, Y.; Takamatsu, T. Raman spectroscopic detection of peripheral nerves towards nerve-sparing surgery. Proc. SPIE 10054, 100541E (2017) 査読有。

(2) 解説論文(計 2 件)

[02] 南川 丈夫、原田 義規、高松 哲郎. 術中応用を目指したラマン散乱分光法～分子振動に基づく医療センシングの可能性～. 光アライアンス 28, 42-47 (2017) 査読無。

[01] 熊本 康昭、高松 哲郎. 医療分野で期待されるフォトンクス研究. フォトンクスニュース 2, 7-11 (2016) 査読無。

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) 招待講演(計 6 件)

[06] 高松哲郎. ラマン散乱による診断支援システム. シンポジウム「ラマン散乱を用いた非侵襲機能解析」第 55 回日本生体医工学会, 2016 年 4 月 28 日(富山国際会議場, 富山)

[05] 高松哲郎. バイオフォトンクスを用いた生体組織センシングの医療応用. シンポジウム「組織・細胞化学からの新たなアプローチ」第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2016 年 9 月 3 日(杏林大学井の頭キャンパス, 東京)

[04] Takamatsu, T. In vivo molecular sensing for image-guided surgery. IEEE CPMT Symposium Japan (ICSJ)2016, 2016 年 11 月 8 日(京都大学時計台百周年記念ホール, 京都)

[03] Takamatsu, T. In vivo Spontaneous Raman Spectroscopy for Image-guided Surgery. Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016 年 12 月 6 日(淡路夢舞台国際会議場, 兵庫)

[02] 南川 丈夫. 医療応用を目指したラマン散乱分光法. 光材料・応用技術研究会第 4 回研究会, 2017 年 3 月 3 日(東京大学山の上会館, 東京)。

[01] 南川 丈夫. 術中医療センシングを目指したラマン散乱分光法. BioOpt Japan 2016, 2016 年 9 月 14 日(パシフィコ横浜 神奈川)。

(2) その他の講演(計 3 件)

[03] Minamikawa, T.; Harada, Y.; Takamatsu, T. Raman spectroscopic detection of peripheral nerves towards nerve-sparing surgery. SPIE Photonics West Biomedical Optics (BiOS 2017), 2017年1月28日~2月2日 (Moscone Center, アメリカ, サンフランシスコ).

[02] 熊本 康昭, 南川 丈夫, 原田 義規, 田中 秀央, 高松 哲郎. ラマン分光法を利用した末梢神経検知. 第64回応用物理学会春季学術講演会, 2017年3月17日 (パシフィコ横浜, 神奈川).

[01] Kumamoto, Y.; Minamikawa, T.; Harada, Y.; Tanaka, H.; Takamatsu, T. Peripheral nerve detection by spontaneous Raman scattering. Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 2016年12月5日~6日 (淡路夢舞台国際会議場, 兵庫県).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

#### (2)

高松 哲郎 (Takamatsu Tetsuro)  
京都府立医科・大学大学院医学研究科  
教授  
研究者番号: 40154900

### (2) 研究分担者

南川 丈夫 (Minamikawa Takeo)  
徳島大学・大学院社会産業理工学研究部・  
講師  
研究者番号: 10637193

原田 義規 (Harada Yoshinori)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科  
准教授  
研究者番号: 10381956

熊本 康昭 (Kumamoto Yasuaki)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科  
助教  
研究者番号: 30611727