

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05238

研究課題名（和文）ラマン散乱光分析とインピーダンス測定を組み合わせた新しい組織診断技術の開発

研究課題名（英文）A new technology for tissue diagnosis with combination of Raman scattering spectrometry and bioimpedance measurement

研究代表者

高成 広起（TAKANARI, Hiroki）

徳島大学・病院・特任講師

研究者番号：70723253

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外電位記録から培養細胞のインピーダンス測定を行い、導電性の異なる細胞でインピーダンスの違いを見出した。また正常熱焼灼を加えた心臓組織においてもインピーダンスの違いを認め、インピーダンスから組織の異常を検出する技術を確認した。顕微鏡型、及び光ファイバー型装置を作成して実験動物の組織にレーザー光を照射し、発生するラマン散乱光を行った結果、正常組織と異常組織（炎症・線維化）で異なるラマン散乱光のスペクトルを検出し、ラマン散乱光分光分析によって組織診断が可能であることを示した。二つの電極間におけるインピーダンスを測定しながら、その間の組織のラマン散乱光分析を行い、各データが相関することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織診断は、患者から生体組織を採取し、これを固定・染色して病理診断医の目視による観察で行われる。迅速性を求められるにも関わらず手間と時間がかかる上に、病理診断医の技量や人手不足なども問題となっている。インピーダンス測定、及びラマン散乱光分光分析によって組織診断をより定性的・定量的に、かつ効率よく行う分析システムが確立されて、診断機器として社会実装された場合、組織診断の自動化・時間短縮ができるだけでなく、組織診断に習熟していない病理診断医でも組織から得られる客観的データを基に適切な診断が下せるようになり、診断・治療のマニュアル化・迅速化が容易になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Impedance measurement of cultured cells was performed from extracellular potential recording, and differences in impedance were found in cells with different conductivity. Moreover, the difference in the impedance was also recognized in the heart tissue in between normal and thermally ablated tissue. The method for detecting tissue abnormality from the impedance value was confirmed.

A microscopic and an optical fiber type device for analyzing Raman scattering light were made. The laser was irradiated to the tissue of the experimental animal, and the difference in the spectrum of Raman scattering light between normal tissue and abnormal tissue (inflammation and fibrosis) were detected, which suggested that tissue diagnosis based on Raman scattering light spectroscopy would be possible.

While measuring the impedance between the two electrodes, Raman scattered light analysis of the tissue between them was performed to show that each data was correlated.

研究分野：心臓生理学

キーワード：ラマン散乱光分析 生体インピーダンス測定 医用工学

1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は、炎症や細胞死で脆弱化した組織の強度を補う防護機構だが、過度の線維化は様々な病態と関連付けられる。線維化は主に、生検サンプルの固定・染色によって病理学的に診断される。近年、心臓においては線維化領域において本来の心筋細胞が持つ興奮性や刺激伝導性の低下が確認され、線維化組織と正常組織の間で導電性、抵抗性(インピーダンス)が異なることが示唆された。しかし生体インピーダンスから組織の性状を判別する検査手技・技術は、一部の例(体脂肪計など)を除いて確立されていない。

物質に単一波長光を照射すると散乱光が発生するが、その中には物質の構成分子に特異的に照射光から波長遷移を生じるラマン散乱光が存在する。ラマン散乱光のスペクトル分析から物性を知ることができる。近年は生体組織や細胞をラマン分光分析で評価する試みが盛んに行われているが、未だ組織診断への応用は完成していない。

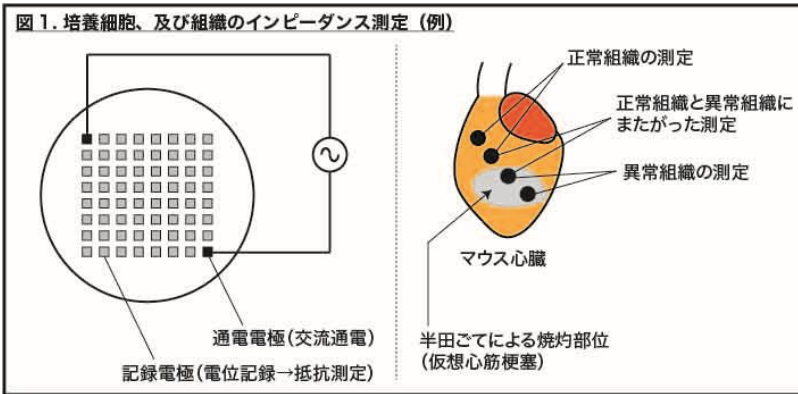
2. 研究の目的

線維化組織において生じる導電性の低下(抵抗の増大)をインピーダンス測定によって、また線維化組織に特徴的なコラーゲン造成をラマン散乱光分光分析法によってそれぞれ捉え、統合的に組織診断を行う組織診断技術の確立を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞と生体組織を対象としたインピーダンス測定：導電性に優れる新生仔ラット心臓を単離して得た心筋細胞(CM)と、導電性が劣るヒト骨格筋芽細胞株(SkMB; Lonza社)導電性の異なる二種類の細胞の配列による導電性の違いを明らかにする実験を行った。SkMBには磁性微粒子を取り込ませ(名古屋大学工学部より供与)ディッシュ直下に設置した磁石によってSkMBのCM内に

図1. 培養細胞、及び組織のインピーダンス測定(例)

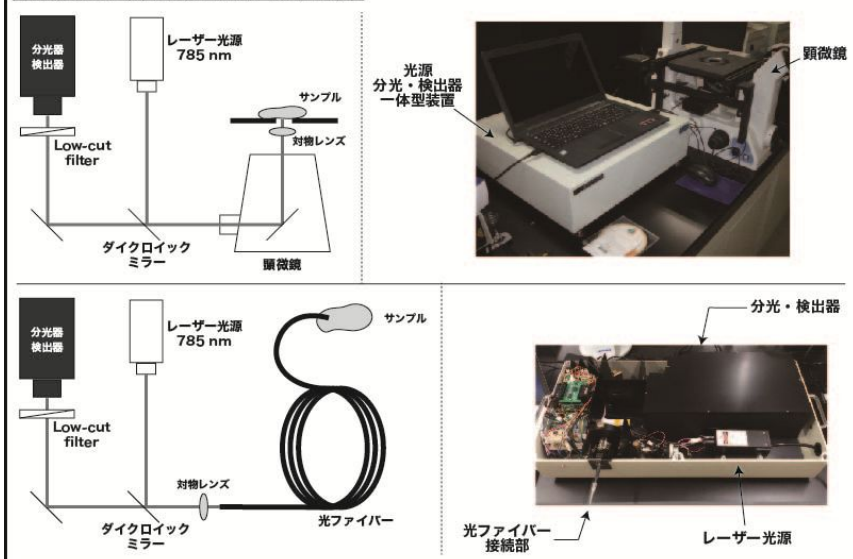


における配置をコントロールした(業績:雑誌論文17.)。64点電極付きディッシュに細胞を培養し、MED64システム(アルファメッドサイエンティフィック社製)で細胞外電位を記録し、任意の二つの電極間に交流電流を印加して周囲に伝わる細胞外電位の興奮伝播速度からインピーダンスを計測した(図1左)。組織のインピーダンス測定では、深麻酔下のマウスから摘出した心臓組織を用いたが、摘出後に心臓の一部には半田ごてで熱焼灼を加え、簡易的に心筋梗塞のモデルとした。定電位測定装置を用いて、組織組織に押し当てた2点の電極に測定電流(2.8 μ A, 1 kHz)の交流電流を印加して組織インピーダンスを計測した(図1右)。またインピーダンス測定プロトコルを最適化するため、コンピュータ上に心筋細胞のバイドメインモデルを作製して交流電流印加のシミュレーションを行った。

(2) 培養細胞と生体組織を対象としたラマン散乱光分析：倒立顕微鏡にレーザー光源と分光・検出器を接続した顕微ラマン装置を作製、顕微鏡ステージ上に設置した培養細胞や生体組織のラマン散乱光の中から、生体に特異的なラマン・スペクトルの検出を行った(図2上段)。

また将来的な医療機械開発を見越して、光ファイバーを介した組織のラマン散乱光分析を行った(図2下段)。いずれの装置もレーザーは、光が生体組織を透過しやすい「生体の窓」に含まれる785nm赤色レーザー(最大出力300mW)を用いた。測定は、培養細胞:新生

図2. 顕微ラマン装置、及びファイバー型ラマン装置

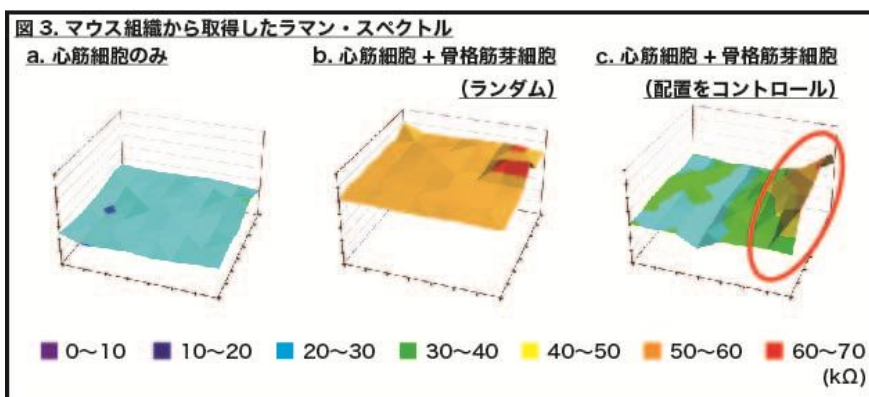


仔ラット心室筋細胞 (CM) 初代培養とヒト線維芽細胞株 (FB; Lonza 社) ラット心臓 (インピーダンス測定に用いたサンプルで、心筋梗塞を模した熱焼灼を加えたもの)、マウス心臓 (コントロール、及び高脂肪食を与えた高脂血症モデル)、マウス耳 (コントロール、及び PMA 塗布による皮膚炎症モデル) を対象とした。培養細胞はガラス底ディッシュに培養し、顕微鏡型ラマン装置のステージ上に設置して計測した。組織は厚さ 0.3 mm 石英カバーガラス上で顕微ラマン装置により計測、もしくはファイバー型ラマン装置の光ファイバー先端を直接組織に押し当てて計測した。

(3) **インピーダンス測定とラマン分光分析の融合**：ラット心臓 (心筋梗塞を模して一部に熱焼灼を加えたもの) を用いて 2 点間の組織インピーダンス測定を行いつつ、ファイバー型ラマン装置を用いて電極間の組織のラマン分光分析を行う、融合実験を行った。

4. 研究成果

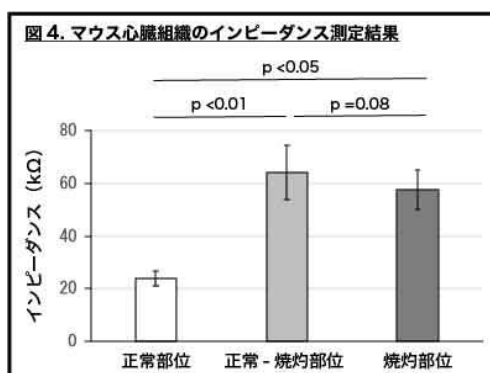
(1-a) **培養細胞のインピーダンス**：電極付き培養ディッシュで CM 及び SKMB の細胞外電位記録



を行い、任意の点から交流電流を印加した際の周囲への興奮伝播から求めたインピーダンス値を図 3 に示す。CM 単一培養で記録されたインピーダンス値は均一であった (図 3a)。CM と SKMB をランダムに培養した共培養系においては、CM

培養と同様にインピーダンス値は記録範囲において一様だったが、CM 培養に比べて興奮伝播速度は遅く、インピーダンス値は高く記録された (図 3b)。磁性微粒子を取り込ませた SKMB の配置を磁石でコントロールして赤丸部分に集中させた共培養系では、CM のみ存在するエリアのインピーダンス値は CM 単一培養と同等だったが、SKMB を配置したエリアのインピーダンス値は著しく高かった (図 3c)。

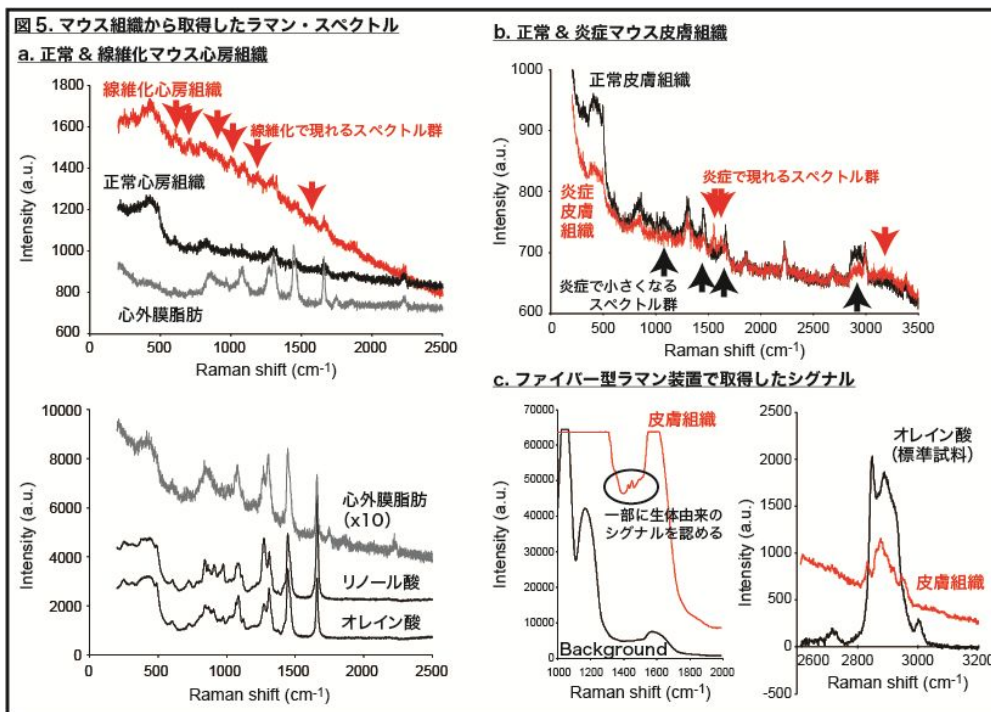
(1-b) **心臓組織のインピーダンス**：マウス心臓組織に密着させた 2 電極間でインピーダンス測定を行った。焼灼部位では正常部位に比べてインピーダンス値が有意に高かった。また正常部位と焼灼部位にまたがったインピーダンス値は、正常部位に比べると有意に高く、焼灼部位に比べると有意差は無かったものの低い傾向にあった (図 4)。これらの結果から、組織のインピーダンス値から導電性の高い組織と低い組織を判別しうることを示された。但し測定値は心臓表面の状態 (乾燥状態) や電極の密着具合に大きく依存し、時に計測が困難であった。



(1-c) **シミュレーション**：一列に並べた心筋バドメインモデルを作製、その両端に交流電流を印加するシミュレーションを行った。なお導電性の低い線維芽細胞を心筋細胞間に介在させて、心筋梗塞のモデルとした。この実験では、細胞外ドメインを伝導する成分が大きくなり、線維芽細胞の介在による影響を見いだすことができなかった。

(2-a) **培養細胞のラマン散乱光分析**：培養細胞を用いた実験では、残念ながらラマン散乱光の情報を得ることができなかった。レーザーが共焦点化されておらず、ガラス由来のラマン散乱光が主に計測されてしまった。本研究で用いた 785 nm レーザーは、従来ラマン分光に用いられる 532 nm レーザーに比べてエネルギーが弱く、発生する散乱光も 532 nm レーザーに比べて 1/10 程度になるとされることから、785 nm レーザーを用いた事によるエネルギー不足を生じた。などの原因が考えられた。現在、光学系の共焦点化、532 nm レーザーの導入など機器の改良を行って実験を継続中である。

(2-b) **実験動物組織のラマン散乱光分析**：高脂肪食を 2 ヶ月間与えたマウスでは心房組織に高度の線維化を生じるが (業績：雑誌論文 2.) 正常の心房組織と線維化心房組織で明らかに異なるラマン・スペクトルが記録され (次項、図 5a 上段) 心臓表面に付着した心外膜脂肪組織では標準試料であるオレイン酸と酷似したスペクトルが記録された (次項、図 5a 下段)。また耳の正常組織と薬剤誘発性の炎症組織を比較したところ、浮腫や炎症を反映していると考えられるシグナルの変化を検出することができた (次項、図 5b)。ファイバー型装置でも同様の記録を試みたところ、ファイバー素材 (ガラス) のシグナルが強く出て分光分析に向かない波数領域はあったものの (次項、図 5c 左)、一部 (3,000 cm^{-1} 付近など) ではシグナルの検出・評価が可能であった (次項、図 5c 右)。



(3) インピーダンス測定とラマン分光の融合：2 電極を心臓の正常組織、もしくは焼灼部位に設置し、その間でラマン分光分析を行ったが、上記(1-b)、(2-b)の測定結果を、それぞれ再現性を持って確認することができた。

(考察と今後の展望) インピーダンス測定では、導電性の高い細胞・組織と、導電性の低い細胞・組織を判別しうることが示された。しかし同じ細胞でも、ディッシュ毎に記録されるインピーダンス値の不均一性が大きく、有意差を見いだせなかった。これは電極インピーダンスの不均一性に由来すると考えられた。また実験では導電性の大きく異なる細胞・組織を比較したが、わずかな導電性の違いまで検出しうるのは検証の余地を残した。またコンピュータシミュレーションでは細胞外の伝導成分が大きすぎて、導電性が異なる細胞が介在することによる違いが明確に示せなかった。今後はモデルの最適化や、二次元・三次元モデルを用いた検証を行う必要がある。

ラマン分光の違いから組織の変化を判別することも可能であった。皮膚炎症モデルで得られたデータの3/4を機械学習(Magellan Blocks)で分析、残り1/4のデータから正常・炎症を診断させて99.7%の正答率を得ており、医療機器としての社会実装も実現性を帯びてきた。しかし学術的には、ラマン・スペクトルの違いが如何なる物質に由来するか不明、Magellan Blocksの分析アルゴリズムがBlack boxで、どのスペクトルを基に診断されたか不明、など解決すべき問題が残る。様々な標準物質や病理組織標本のラマン分光分析を行ってデータベース化すると共に、独自の分析プログラムを作成して、より学術的な裏付けを持った分析が可能なシステムへと昇華させる必要がある。また生体由来ラマン散乱光は極めて微弱で、時に計測が困難であるため、生体由来ラマン散乱光を増幅する基盤技術(表面プラズモニクスなど)との融合を目指す。これらの技術が確立すれば、ラマン分光による組織診断の医療応用がより実現性を帯びると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 22件)

1. *Umeda R, *Takanari H (*: equal contribution), Ogata K, Matsumoto S, Kitano T, Ono K, Tokumaru O. Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors. *J Clin Biochem Nut* 2019; 64: 20-26. doi:10.3164/jcfn.18-48. (査読あり)
2. Kondo H, Abe I, Takanari H (28人中5番目), Takahashi N, et al. Interleukin 10 treatment ameliorates high-fat diet-induced inflammatory atrial remodeling and fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2018; 11: e006040. doi:10.1161/CIRCEP.117.006040. (査読あり)
3. Baburin I, Sary-Weinzinger A, van der Heyden MAG, Takanari H (16人中11番目), Jonsson M, Vos MA, Hering S, et al. Dehydroevodamine and hortiamine, alkaloids from the traditional Chinese herbal drug *Evodia rutaecarpa* are I_{Kr} blockers with proarrhythmic effects *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacol Res* 2018; 131: 150-163. doi:10.1016/j.phrs.2018.02.024. (査読あり)
4. Masuda K, Takanari H (7人中2番目), et al. Testosterone-mediated upregulation of delayed rectifier potassium channel in cardiomyocytes causes abbreviation of QT intervals in rats. *J Physiol Sci* 2018. doi:10.1007/s12576-017-0590-4. (査読あり)

5. Sakata K, **Ashihara T** (corresponding, 8人中8番目), et al. Not all rotors, effective ablation targets for nonparoxysmal atrial fibrillation, are included in areas suggested by conventional indirect indicators of atrial fibrillation drivers: ExTRa Mapping project. *J Arrhythmia* 2018; 34: 176-84. doi:10.1002/joa3.12036. (査読あり)
6. 稲田慎、柴田仁太郎、**芦原貴司**、中沢一雄. 房室結節における心拍制御機構の解析：コンピュータシミュレーションによる検討. *計測と制御* 2018; 57: 563-569. doi:org/10.11499/sicejl.57.563. (査読あり)
7. Ji Y, van Haften G, **Takanari H** (11人中9番目), van der Heyden MAG, et al. PA-6 inhibits inward rectifier currents carried by V93I and D172N gain-of-function KIR2.1 channels, but increases channel protein expression. *J Biomed Sci* 2017; 24: 44. doi:10.1186/s12929-017-0352-x. (査読あり)
8. Ji Y, **Takanari H** (9人中2番目), Vos MA, van der Heyden MAG, et al. Class III antiarrhythmic drugs amiodarone and dronedarone impair KIR2.1 backward trafficking. *J Cell Mol Med* 2017; 21: 2514-23. doi.10.1111/jcmm.13172. (査読あり)
9. Kawatou M, **Ashihara T** (7人中6番目), Yamashita JK, et al. Modelling Torsade de Pointes arrhythmias in vitro in 3D human iPS cell-engineered heart tissue. *Nat Commun* 2017; 8: 1078. doi:10.1038/s41467-017-01125-y. (査読あり)
10. Kubo T, **Ashihara T**, Tsubouchi T, Horie M. Significance of integrated in silico transmural ventricular wedge preparation models of human non-failing and failing hearts for safety evaluation of drug candidates. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2017; 83: 30-41. doi:10.1016/j.vascn.2016.08.007. (査読あり)
11. *Donnio LM, *Bidon B, **Hashimoto S** (17人中3番目, *: equal contribution), Egly JM, et al. MED12-related XL1D disorders are dose-dependent of immediate early genes (IEGs) expression. *Hum Mol Genet* 2017; 26: 2062-2075. doi:10.1093/hmg/ddx099. (査読あり)
12. **高成広起**: Digitalis: How to use this traditional drug in modern medicine. *循環器内科* 2016; 80: 3-9. ISSN:2188-9449. (査読なし)
13. 平木洋子, **高成広起**: A new type of ATP-sensitive potassium channelopathy: Cantú Syndrome. *脳と発達* 2016; 48: 325-331. PMID:30010274. (査読あり)
14. **Takanari H** (21人中筆頭), Kodama I, Anderson ME, van der Heyden MAG, Vos MA, et al. Calmodulin/CaMKII inhibition improves intercellular communication and impulse propagation in the heart, and is anti-arrhythmic under conditions when fibrosis is absent. *Cardiovasc Res* 2016; 111: 410-421. doi:10.1093/cvr/cvw173. (査読あり)
15. Kushiya Y, Honjo H, **Takanari H** (9人中4番目), Sakuma I, Kodama I, et al. Partial IK1 blockade destabilizes spiral wave rotation center without inducing wave breakup and facilitates termination of reentrant arrhythmias in ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 311: H750-H758. doi:10.1152/ajpheart.00228.2016. (査読あり)
16. Morishima M, **Takanari H** (8人中5番目), Miyamoto S, Moriyama M, Ono K, et al. Atrial fibrillation-mediated up-regulation of miR-30d regulates myocardial electrical remodeling of G-protein-gated K⁺ channel, IK₁ ACh. *Circ J* 2016; 80: 1346-1355. doi:10.1253/circj.CJ-15-1276. (査読あり)
17. **Takanari H** (corresponding, 13人中筆頭), Nakai J, Ito A, Honda H, Kodama I, Lee JK, et al. A new in vitro co-culture model using magnetic force-based nanotechnology. *J Cell Physiol* 2016; 231: 2249-2256. doi:10.1002/jcp.25342. (査読あり)
18. Freyermuth F, Horie M, **Ashihara T** (43人中38番目), et al. Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Commun* 2016; 7: 11067. doi:10.1038/ncomms11067. (査読あり)
19. Hasegawa K, **Ashihara T** (10人中6番目), Horie M, et al. Early repolarization and risk of arrhythmia events in long QT syndrome. *Int J Cardiol* 2016; 223: 540-542. doi:10.1016/j.ijcard.2016.08.215. (査読あり)
20. Sonoda K, **Ashihara T** (8人中4番目), Horie M, Minamino T, et al. High frequency of early repolarization and Brugada-type electrocardiograms in hypercalcemia. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2016; 21: 30-40. doi:10.1111/anec.12303. (査読あり)
21. 諫田泰成、**芦原貴司**、黒川洵子. ヒトiPS細胞から成熟した心筋細胞の開発と安全性評価への応用. *日本薬理学会誌* 2016; 147: 334-338. doi:org/10.1254/fpj.147.334. (査読あり)
22. **Hashimoto S**, Anai H, Hanada K. Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders. *Genes Environ* 2016; 38: 9. doi:10.1186/s41021-016-0037-9. (査読あり)

[学会発表](計 10件)

1. **Takanari H**. The influence of KATP channel abnormality on calcium handling of endoplasmic reticulum. The 9th. Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. March, 2019, Kobe, Japan.
2. **Ashihara T**. Is the ExTRa Mapping-guided ablation targeting non-passively activated areas a novel and effective approach for non-paroxysmal atrial fibrillation? 第

- 83 回日本循環器学会学術集会. 2019 年 3 月, 横浜
3. **高成広起, 井上高教, 橋本悟**. 皮膚の炎症を定量評価する光技術を用いた計測機器の開発. 第 6 回 TR 推進合同フォーラム. 2018 年 11 月, 福岡.
 4. **Ashihara T**. Fibroblast hypothesis of AF chronicity: From in silico to clinical real-time phase mapping studies. The 11th Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. October, 2018, Taipei, Taiwan.
 5. **Ashihara T**. What is the best strategy to identify the rotational activities: Real time mapping of AF rotors: ExTRa Mapping project. The 11th Asia-Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session. October, 2018, Taipei, Taiwan.
 6. **Ashihara T**, et al. Long-term effect of ExTRa Mapping-guided rotor modulation on persistent/long-standing persistent atrial fibrillation. 第 65 回日本不整脈心電学会, 2018 年 7 月, 東京.
 7. **Ashihara T**, et al. A combined study of clinical ExTRa Mapping and in silico. 第 65 回日本不整脈心電学会, 2018 年 7 月, 東京.
 8. **井上高教, 高成広起, 橋本悟**. ラマン散乱光分析を用いた皮膚悪性黒色腫の非侵襲的組織診断機器の開発. 第 4 回 TR 推進合同フォーラム. 2016 年 11 月, 福岡.
 9. **高成広起**. 不整脈基質におけるギャップ結合と線維化. 第 1 回 START 研究会(招待講演). 2016 年 7 月, 札幌.
 10. **Takanari H**. Structure-based analysis of the function of Kir2.1 channel using novel IK1 blocker PA-6. 第 93 回日本生理学会大会. 2016 年 3 月, 札幌.

〔図書〕(計 1 件)

1. 副島京子, **芦原貴司(14人中3番目)**ら. 心電図検定公式問題集&ガイド: 受験者必携! 2 級/3 級. メディカ出版, 2018 年, 1-128.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 散乱光分析による皮膚疾患の検出方法
発明者: 井上高教、高成広起、橋本悟、寺林健
権利者: 大分大学
種類: 特許
番号: 特願 2017-108201
出願年: 2017 年
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

該当無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 井上 高教

ローマ字氏名: INOUE, Takanori

所属研究機関名: 大分大学

部局名: 理工学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40243969

研究分担者氏名: 芦原 貴司

ローマ字氏名: ASHIHARA, Takashi

所属研究機関名: 滋賀医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 80396259

研究分担者氏名: 橋本 悟

ローマ字氏名: HASHIMOTO, Satoru

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 環境医学研究所

職名: 特任准教授

研究者番号(8桁): 60352150

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。