

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04763

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いた、好酸球性食道炎の非生検診断法の開発

研究課題名(英文) The development of a Raman spectroscopic technique to diagnose Eosinophil Esophagitis non-bioptically

研究代表者

山本 達之 (Yamamoto, Tatsuyuki)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60230570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：医療ラマンに特化した装置開発を行なった。自動測定ソフトウェアと自動焦点距離調整ソフトによって、ラマン分光学の専門家でなくても測定可能とすることができた。ただし、蛍光の強い試料では、自動焦点距離調整が困難な点に問題を残している。ヒト血液から分離した白血球の中から、好酸球を判別可能であることも明らかにすることができた。基礎的データを集積するための環境はほとんど整えることができたが、内視鏡に組み込み可能なファイバラマン装置開発を、関西学院大学の佐藤英俊教授の協力によってさらに推進する予定にしている。

研究成果の概要(英文)：A new Raman Spectrophotometer especially designed for biomedical applications was developed. The spectrophotometer was so designed to perform automatically with a program to determine the appropriate focal distance. However, the automatic measurement is difficult in the case of strong auto-fluorescent samples. We could discriminate the human eosinophil from other white blood cells. We further make forward the development of Raman fiber device by the collaborations with professor Hidetoshi Sato's group.

研究分野：生命分子分光学

キーワード：ラマンスペクトル 好酸球性食道炎

1. 研究開始当初の背景

好酸球性食道炎は、食道粘膜に好酸球が多数浸潤して炎症を引き起こす遅延型の食物アレルギー性疾患の一種で、主訴は、嚥下障害、胸のつかえ感、胸やけなどである。本疾患概念の確立は、約 20 年前と比較的最近のことである。その間、本疾患の患者数は約 2 倍に増加し、増加傾向は今も続いている。通常の食道炎とは異なった治療が必要なため、内視鏡検査で、好酸球性食道炎に典型的な“縦走溝”の存在などを頼りに診断を行う。しかし、診断困難な症例が多く、確定診断のため食道粘膜の生検が行われるのが一般的である。ただし、現在、生検を行うべき箇所の基準が明確でなく、多数の組織生検を行っても診断は困難である。また、患者に高齢者が多く、抗血栓薬の服用者も多いため、生検による出血とともに大きな問題となっている。しかし、低侵襲的に正確に診断を行うことさえ可能となれば、既に有効な治療法は開発されている。すなわち、好酸球性食道炎の第一選択である局所作用ステロイドを用いた治療や、臨床開発が活発に行われている抗 IL-5 抗体や抗 IL-13 抗体を用いた有効な治療を行うことが可能となる。このような背景の下、患者負担の少ない非生検的な新規診断技術の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

内視鏡に組み込み可能な、ラマンスペクトル測定用ファイバスコープ型装置を開発する。その装置に付属させる診断ソフトも開発する。これらの開発によりラマンスペクトル測定の専門家でも好酸球性食道炎の診断が可能になる。ファイバスコープ先端部分の低倍率対物レンズを通して、レーザー光を食道粘膜に照射し、散乱光を集光する。集光した散乱光からラマン散乱光のみを分光して、分光器でスペクトルを得る。好酸球の顆粒に含まれる EP が、1550 と 1610 cm^{-1} 付近に与える典型的な 2 本のラマンバンドは、他の白血球には現れない。これらバンドの有無により、好酸球浸潤の有無を診断する。バンド有無の判断は、ソフトウェアが自動的に判別し、モニタ画面上に好酸球の有無を文字で表記する。ブザー音なども併用して装置使用者に知らせることができるよう設計し、臨床現場で活用する。

3. 研究の方法

ファイバスコープ型ラマンスペクトル測定装置と、好酸球性食道炎の有無の自動判別ソフトウェアの開発を行う。これにより、マウス食道粘膜のラマンスペクトルから、好酸球由来のエオシノフィルペルオキシダーゼ (EP) の有無を診断する。開発装置の試作品を、実際に内視鏡に組み込んで、好酸球性食道炎の臨床診断を実施し、従来法と比較する。臨床診断は、島根大学附属病院の内科診療で行う。平成 27~29 年度の 3 か年で実施する

予定である。研究実施体制は、以下の通り。山本(研究代表者)とヌータラパティ(連携研究者): ラマン装置を用いたラマン測定と条件最適化

木下(研究分担者)と大嶋(連携研究者): モデルマウス作成、病理組織検査および臨床診断協力企業: ラマン装置とソフトウェアの開発

4. 研究成果

医療ラマンに特化した装置開発を行なった。(写真 1)自動測定ソフトウェアと自動焦点距離調整ソフトによって、ラマン分光学の専門家でも測定可能とすることができた。



写真 1. 開発した医療ラマン測定装置

ただし、蛍光の強い試料では、自動焦点距離調整が困難な点に問題を残している。ヒト血液から分離した白血球の中から、好酸球を判別可能であることも明らかにすることができた。基礎的データを集積するための環境はほとんど整えることができたが、内視鏡に組み込み可能なファイバラマン装置開発を、関西学院大学の佐藤英俊教授の協力によってさらに推進する予定にしている。

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 5 件)

1. Imaging phospholipid conformational disorder and packing in giant multilamellar liposome by confocal Raman microspectroscopy, Hemanth Noothalapati, Keita Iwasaki, Chikako Yoshimoto, Keisuke Yoshikiyo, Tomoe Nishikawa, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi and Tatsuyuki Yamamoto, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **187**(5), 186–190, 2017, 査読有 doi:10.1016/j.saa.2017.06.060

2. Biological and Medical Applications of Multivariate Curve Resolution Assisted Raman Spectroscopy, Hemanth Noothalapati*, Keita Iwasaki and Tatsuyuki Yamamoto, *Analytical Sciences*, **33**(1), 15-22, 2017, 査読有 DOI: 10.2116/analsci.33.15

3. Blood identification and discrimination of human and nonhuman

using portable Raman spectroscopy, Junko Fujihara, Yasuhisa Fujita, Tatsuyuki Yamamoto, Naoki Nishimoto, Kaori Kimura-Kataoka, Satsuki Kurata, Yoshikazu Takinami, Toshihiro Yasuda, Haruo Takeshita, *International Journal of Legal Medicine*, **131**, 319-322, 2017, 査読有 DOI: 10.1007/s00414-016-1396-2

4. Label-free Chemical Imaging of Fungal Spore Walls by Raman Microscopy and Multivariate Curve Resolution Analysis, Hemanth Noothalapati, Takahiro Sasaki, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, and Tatsuyuki Yamamoto, *Scientific Reports*, **6**, Article number:27789, 2016, 査読有 DOI: 10.1038/srep27789

5. Towards the development of a non-biopic diagnostic technique for eosinophilic esophagitis using Raman spectroscopy, Hemanth Noothalapati, Suguru Uemura, Naoki Ohshima, Yoshikazu Kinoshita, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, and Tatsuyuki Yamamoto, *Vibrational Spectroscopy*, **85**, 7-10, 2016, 査読有 DOI : 10.1016/j.vibspec.2016.03.016

{学会発表}(計 46件)

1. Objective Discrimination of Breast Cancer Cells (MCF-7) from Normal Human Mammary Epithelial Cells (HMEpC) by Raman Microspectroscopy (RM): Molecular Basis for Application of RM in Cancer Diagnosis, Hemanth Nag Noothalapati Venkata, Yui Suzuki, Asuka Asuka, Riruke Maruyama, Tatsuyuki Yamamoto, USCAP 2018 Annual Meeting, Mar.,17-23, Vancouver(Canada), 2018

2. Objective Discrimination of Breast Cancer Cells from Normal Human Mammary Epithelial Cells by Raman microspectroscopy, 90 Years of Raman Effect: Current Status and Future Directions, Hemanth Noothalapati, Yui Suzuki, Riruke Maruyama, Tatsuyuki Yamamoto, Bagalore(India), Feb. 27th-Mar.2nd, 2018

3. Raman imaging study on single-celled microorganisms, Tatsuyuki Yamamoto, 90 Years of Raman Effect: Current Status and Future Directions, Indian Institute of Science, Bagalore(India), Feb. 27th-Mar.2nd, 2018

4. Versatile properties of ZnO films and nanoparticles for nanomedical applications, Yasuhisa Fujita, Jie

Lin, Junko Fujihara, Haruo Takeshita, Ryosuke Tanino, Takeshi Isobe and Tatsuyuki Yamamoto, 11th International Symposium on Nanomedicine(ISNM2017), Sendai(Tohoku University), Dec. 13-15, 2017

5. The EGFR axes modulate mitochondria proliferation and establish Raman spectroscopic analysis for tummmor associated mitochondria, Shuan su C. Yu, Hemanth Noothalapati, Tatsuyuki Yamamoto, and Wei-hsuan Yu, Biomedical Molecular Imaging 2017, in Wulai District, New Taipei City, Taiwan, 10th to 12th November, 2017

6. Raman imaging study on living single-celled microorganisms, Tatsuyuki Yamamoto and Hemanth Noothalapati, Biomedical Molecular Imaging 2017, in Wulai District, New Taipei City, Taiwan, 10th to 12th, Nov., 2017

7. Univariate and multivariate Raman imaging studies on living single celled microorganisms, Tatsuyuki Yamamoto and Hemanth Noothalapati, International Conference on Spectroscopy of Biomolecules and Advanced Materials, Christian College, Chengannur, Kerala, India, Oct., 4th-7th, 2017

8. Medical Applications of Zinc Oxide Films and Nanoparticles, Yasuhisa Fujita, Jie Lin, Ryosuke Tanino, Tatsuyuki Yamamoto, Junko Fujihara, Haruo Takeshita and Takeshi Isobe, Fifth China-Japan Nanomedicine International Symposium, China(蘇州), 16th-18th, Sep., 2017

9. Applications of Raman spectrometry to cytological diagnosis, Yasuhisa Fujita, Hiroki Hamada, Tsuyoshi Araki, Asuka Araki, Noriyoshi Ishikawa, Mamiko Nagase, Hemanth Noothalapati, Tatsuyuki Yamamoto and Riruke Maruyama, Fifth China-Japan Nanomedicine International Symposium, China(蘇州), 16th-18th, Sep., 2017

10. Studying single cells by confocal Raman microspectroscopy: What can we learn?, Hemanth Noothalapati, and Tatsuyuki Yamamoto, Sixth Asian Spectroscopy Conference, Taiwan(新竹), Sep., 3rd-6th, 2017

11. Time-resolved intracellular distribution of paramylon and wax ester in Euglena cell by MCR assisted Raman microspectroscopy, Tatsuyuki Yamamoto, Sixth Asian Spectroscopy Conference, Taiwan(新竹), Sep., 3rd-6th, 2017

12. Probing redox imbalance of cytochrome c in ataxia and male sterility

by resonance Raman microspectroscopy, K. Iwasaki, H. Noothalapati, S. Abdullah, A. Nagai and T. Yamamoto, Fifth Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan (嘉義), Jun. 27-30, 2017

13. Imaging pharmacology in single yeast cells by confocal Raman microspectroscopy, Hemanth Noothalapati, Venkatesh Kaliaperumal, Tatsuyuki Yamamoto and Hiro-o Hamaguchi, Fifth Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan (嘉義), Jun. 27-30, 2017

14. A Raman imaging study on living single-celled microorganisms, T. Yamamoto, A. Kaneko, S. Enokizu, H. Noothalapati, M. Kawamukai, T. Kaino, T. Ishikawa, Y. Tanaka, M. Ando, and H. Hamaguchi, Fifth Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan (嘉義), Jun. 27-30, 2017

15. A RAMAN IMAGING STUDY ON THE MOLECULAR DISTRIBUTIONS IN SINGLE-CELLED ORGANISMS, T. Yamamoto and H. Noothalapati, 3rd International Symposium on Weak Molecular Interactions, Opole, March, 2017

16. Discrimination of breast cancer cells from normal cells by Raman spectroscopy and chemometrics, Yui Suzuki, Keita Iwasaki, Hemanth Noothalapati, Riruke Maruyama and Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

17. Development of a non-biopic diagnostic method for eosinophilic esophagitis using Raman spectroscopy, Suguru Uemura, Hemanth Noothalapati, Naoki Ohshima, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, Yoshikazu Kinoshita and Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

18. In vivo chemical imaging of sporulation process in fission yeast cells by confocal Raman microscopy, Seiya Enokidzu, Keita Iwasaki, Suguru Uemura, Hemanth Noothalapati, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai and Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 81, 2016

19. Elucidation of PV membrane differentiation mechanism in the green Paramecium and Chlorella symbiosis by Raman microspectroscopy, Naoyuki Yasumura, Suguru Uemura, Keita Iwasaki,

Hemanth Noothalapati, Yuuki Kodama and Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

20. A resonance Raman spectroscopic study on the redox states of cytochrome b and c of ataxia and male sterility mouse, Keita Iwasaki, Hemanth Noothalapati, Sheikh Abdullah, Atsushi Nagai and Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

21. An exploratory study on dancing body-like granule of symbiotic yeasts found in stag beetles by Raman microspectroscopy, Hirokazau Kobayashi, Masahiko Tanahashi, Masahiro Ando, Hemanth Noothalapati, Takema Fukatsu, Hiro-o Hamaguchi, and Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

22. Studies on a β -cyclodextrin derivative induced destruction process of liposomal membrane by confocal Raman microspectroscopy, Chikako Yoshimoto, Akiko Miyazako, Keita Iwasaki, Hemanth Noothalapati, Atsushi Miyagawa, Hatsuo Yamamura, Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

23. A time lapse study on the production efficiency of Paramylum and Wax ester in Euglena cells by Raman microspectroscopy, Asuka Kaneko, Ayano Toyama, Suguru Uemura, Keita Iwasaki, Hemanth Noothalapati, Yuji Tanaka, Takahiro Ishikawa and Tatsuyuki Yamamoto, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

24. Visualizing pharmacokinetics and pharmacodynamics at the single cell level by Confocal Raman Microspectroscopy, Hemanth Noothalapati, Venkatesh Kaliaperumal, Tatsuyuki Yamamoto and Hiro-o Hamaguchi, A Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

25. In situ Raman spectral measurements of fresh blood of dry wood termite, Tatsuyuki Yamamoto, Keita Iwasaki, Hemanth Noothalapati and Masaaki Azuma, Japan Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, Awajishima, Dec., 2016

26. Recent Advances in Biomedical Applications of Raman Spectroscopy, Tatsuyuki Yamamoto, and Hemanth

Noothalapati, 10th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016), Tsukuba, 24-Nov-16, 2016

27. Imaging yeast cell wall architecture and studying the effect of anti-fungal drug terbinafine at the single cell level by Raman microscopy, Hemanth Noothalapati and Tatsuyuki Yamamoto, International Conference and Summit in Industrial and Pharmaceutical microbiology, Malaysia, 17-Oct-2016

28. Stable isotope probing coupled Raman microscopy: An efficient way to study single cell biochemistry, Hemanth Noothalapati and Tatsuyuki Yamamoto, International Conference and Summit in Industrial and Pharmaceutical microbiology, Malaysia, 17-Oct-2016

29. Detection of Eosinophils for the development of a new Raman diagnostic technique for Eosinophilic Esophagitis, Tatsuyuki Yamamoto, Suguru Uemura, Hemanth Noothalapati, Naoki Oshima, Yoshikazu Kinoshita, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, The 6th Biomedical Molecular Imaging Symposium, Taiwan, 12-Nov-2016

30. Application of Raman Spectroscopy on Living Cells and Tissues -Recent Works in Raman Project Center for Medical and Biological Applications of Shimane University, Tatsuyuki Yamamoto and Hemanth Noothalapati, International Conference on Perspectives in Vibrational Spectroscopy, India, 05-Nov-2016

31. Recent Advances of Raman Project Center for Medical and Biological Applications, Shimane University, Tatsuyuki Yamamoto, International Conference on Recent Trends in Engineering and Technology 2016(ICoRTET2016), India, 04-Oct-2016

32. A Raman spectroscopic study on the symbiotic yeast cells found in the mycangium of stag beetle, H. Kobayashi, M. Tanahashi, M. Ando, H. Noothalapati, T. Fukatsu, H. Hamaguchi, and T. Yamamoto, Fourth Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan, Jun. 29-Jul.01, 2016

33. A resonance Raman spectroscopic study on the redox states of cytochrome b and c in mitochondria isolated from mouse nerve cells with mitochondrial diseases, K. Iwasaki, H. Noothalapati, S. Abdullah, A. Nagai, and T. Yamamoto, Fourth Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan, Jun. 29-Jul.01, 2016

34. Detection of Eosinophils on the Tissue of Esophagus by a Newly Developed

Fiber Raman Spectrophotometer, T. Yamamoto, S. Uemura, H. Noothalapati, N. Oshima, Y. Kinoshita, M. Ando, H. Hamaguchi, Fourth Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan, Jun. 29-Jul.01, 2016

35. Medical Applications of Zinc Oxide Films and Nanoparticles, Yasuhisa Fujita, Jie Lin, Ryousuke Tanino, Tatsuyuki Yamamoto, Junko Fujihara, Haruo Takeshita and Takeshi Isobe, The 4th China-Japan Symposium on Nanomedicine, 北九州(北九州国際会議場), May, 12-13, 2016

36. A Raman Spectroscopic Study On The Spore Formation Process Of Fission Yeast At Starvation State, T. Yamamoto, T. Sasaki, H. Noothalapati, T. Kaino, M. Kawamukai, and H. Hamaguchi, Pacificchem 2015, Honolulu, Dec. 15-20, 2015

37. Biological and medical applications of Raman spectroscopy, H. Noothalapati and T. Yamamoto, International Conference on Light Quanta: Modern Perspectives and Application, Allahabad, Dec. 14-16, 2015

38. New development of a Raman diagnosis for Eosinophil Esophagitis, T. Yamamoto, S. Uemura, H. Noothalapati, N. Oshima, Y. Kinoshita, M. Ando and H. Hamaguchi, Biomedical Molecular Imaging 2015, Taiwan, Nov. 06-07, 2015

39. Visualizing Fungal Cell wall architecture by confocal Raman microscopy, H. Noothalapati, M. Kawamukai and T. Yamamoto, 5th Asian Spectroscopy Conference, Sydney, Sep. 29-Oct. 02, 2015

40. Development of a non-bioptic diagnostic technique for eosinophilic esophagitis using Raman spectroscopy, T. Yamamoto, H. Noothalapati, S. Uemura, N. Ohshima, Y. Kinoshita, M. Ando, and H. Hamaguchi, ICAVS 2015, Wien, Jul. 12-16, 2015

41. Visualizing molecular distributions during sporulation process of fission yeast by confocal Raman microscopy, H. Noothalapati, T. Sasaki and T. Yamamoto, Third Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan, Jun. 30-Jul.03, 2015

42. Development of a Raman diagnosis for eosinophilic esophagitis, S. Uemura, H. Noothalapati, N. Ohshima, M. Ando, H. Hamaguchi, Y. Kinoshita, and T. Yamamoto, Third Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy, Taiwan, Jun. 30-Jul.03, 2015

43. A resonance Raman spectroscopic study on the redox states of cytochrome b and c in mitochondria of mouse nerve cells with mitochondrial diseases, K. Iwasaki, H. Noothalapati, S. Abdullah, A. Nagai, and T. Yamamoto, Third Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy , Taiwan, Jun. 30-Jul.03, 2015

44. Development of new medical diagnostic techniques by Raman spectroscopy, T. Yamamoto, S. Uemura, H. Noothalapati, N. Ohshima, Y. Kinoshita, M. Ando, and H. Hamaguchi , Third Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy , Taiwan, Jun. 30-Jul.03, 2015

45. Phototoxicity and Bactericidal Action of Zinc Oxide Nanoparticles., Yasuhisa Fujita, Hideki Hashimoto, Jie Lin, Tatsuyuki Yamamoto, Junko Fujihara, Haruo Takeshita, The 3rd China-Japan Symposium on Nanomedicine (北京), Jun. 19-20, 2015

46. BIOMEDICAL APPLICATIONS OF RAMAN SPECTROSCOPY - Medical Diagnosis - , T. Yamamoto, M. Kawamukai, Y. Kinoshita, A. Nagai, and H. Hamaguchi, 2nd Symposium on Weak Molecular Interaction, Tokyo, mar, 4-6, 2015

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称：ラマン散乱光の観測方法、ラマン散乱光の観測装置及びプログラム

発明者：山本達之，ヘマンス ニータラパティ，上村魁，濱口宏夫，安藤正浩

権利者：島根大学，分光科学研究所

種類：発明

番号：特願 2016-007565，特開 2017-129389

出願年月日：2016年1月19日

国内外の別：国内

名称：ラマンスペクトル測定試料の深さの自動検知のための新規手法

発明者：山本達之，Hemanth Noothalapati，岩崎啓太，濱口宏夫，安藤正浩

権利者：島根大学，分光科学研究所

種類：発明

番号：特願 2017-243613

出願年月日：2017年12月20日

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 達之 (YAMAMOTO, Tatsuyuki)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60230570

(2)研究分担者

木下 芳一 (KINOSHITA, Yishikazu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：30243306

(3)連携研究者

大嶋 直樹 (OHSHIMA, Naoki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10403461

ヘマンス ニータラパティ (NOOTHALAPATI, Hemanth)

島根大学・戦略的研究推進センター・助教

研究者番号：30748025

(4)研究協力者

なし