

令和元年6月19日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01366

研究課題名（和文）ラマン散乱光を用いたin vivo心筋バイアビリティ解析法の創出

研究課題名（英文）Analysis of myocardial viability by using Raman spectroscopy

研究代表者

原田 義規（Harada, Yoshinori）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：10381956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラマン分光法を用いて心筋バイアビリティを非染色で解析可能な基礎技術の開発を目指した。すなわち、ラマン顕微鏡を用いて、虚血性心疾患（超急性期、慢性期）に特徴的なラマンスペクトルの探索を行った。ラットのランゲンドルフ灌流心およびヒト陳旧性心筋梗塞巣を用いて解析したところ、超急性期～慢性期の虚血心においてそのラマンスペクトルは鋭敏に変化していた。ラマン分光法によりin vivoで心筋バイアビリティを鑑別できる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常、化学固定された組織で解析可能な心臓組織の観察が、ラマン分光法を用いることにより、生きたままの状態で解析できることが示された。ラマン分光法は染色の必要がないため、本法を術中観察へ応用すれば、心筋バイアビリティ診断に将来展開できる可能性がある。したがって、本手法は観血的に組織を採取する生検診断を患者に強いることなく、無侵襲で心臓組織診断を行うことにも発展しうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we were sought to develop a basic technology that can analyze myocardial viability without staining using Raman spectroscopy. Raman microspectroscopy was used to search for Raman spectral features of ischemic heart diseases in hyperacute and chronic phases. Analyses of Langendorff-perfused rat hearts and old human myocardial infarcts revealed that Raman spectra became altered clearly in the hyperacute and chronic ischemic hearts. We expect that Raman spectroscopy will become discriminating of myocardial viability in vivo in the future.

研究分野：病理学

キーワード：ラマン分光法 虚血心

## 1. 研究開始当初の背景

虚血性心筋症の治療方針を決定する際、心筋バイアビリティ（虚血/梗塞に陥った心筋の回復能）の評価は重要である。心臓外科医は心筋バイアビリティを正確に評価することで初めて術式を決定できる。梗塞に既に陥り回復不能な心筋組織の診断に加えて、気絶心筋など心筋灌流が再開すると壁運動が改善する心筋組織の診断も重要である。現在、心筋バイアビリティは、核磁気共鳴法（MRI）、心筋シンチグラフィなどの方法を用いて評価されているが、正確な心筋バイアビリティの評価には心臓を直視できる手術中に行うことが必要であり、術中にリアルタイムで評価可能な新たな技術を開発することは喫緊の課題である。研究代表者らは、染色を必要としない組織診断法の開発を目指して、振動分光法、特にラマン散乱分光法を用いる手法の提案および開発を行ってきた（Biochem Biophys Res Commun 2009;382:370、Curr Pharm Biotechnol 2013;14:133、Anal Chem 2014;86:6903）。

ラマン散乱光は、光が物質に当たった際に散乱する、その物質を構成する分子固有の波長をもつ光である。つまり、ラマン散乱光を分光することで、その物質の分子構成をスペクトル情報として把握することができる。したがって、従来は生体から組織を取り出し染色しなければ組織情報を取得できない状況から、ラマン散乱光を用いることで非侵襲的、無標識で生体組織を鑑別できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがこれまで行ってきたラマン散乱光を用いた心臓組織観察技術を基盤に、ラット心臓等を用いて非侵襲かつ包括的に心筋バイアビリティを *in vivo* で解析可能な基礎技術の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、ラマン顕微鏡を用いて、虚血性疾患（超急性期、慢性期）に特徴的なラマンスペクトルの探索および解析法の開発を行い、得られたラマンスペクトルから散乱分子の同定を行った。ラット検体に加えてヒト手術標本も用いて解析を行った。

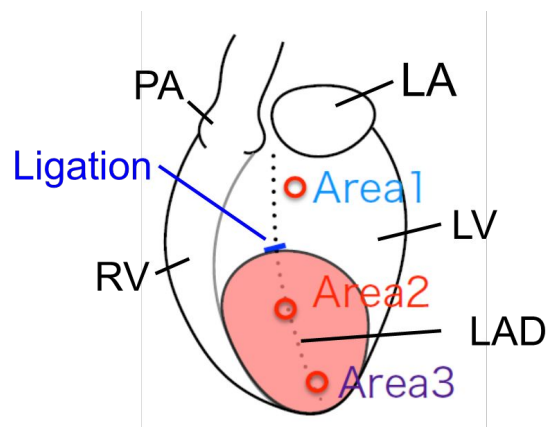
## 4. 研究成果

虚血性疾患（超急性期）における特徴的なラマンスペクトルの探索については、ラットのランゲンドルフ灌流心を用いて解析を行った。すなわち、ラットのランゲンドルフ灌流心において冠動脈前下降枝を結紮し、心虚血再灌流モデルを作製し、532 nm 励起光を用いて心外膜下心筋のラマンスペクトルを測定した（図1）。すなわち、結紮部位の上流および下流において経時的なラマンスペクトル変化を観察した。

還元型シトクロム分子からのラマン散乱光を反映する  $750\text{ cm}^{-1}$  のピーク強度およびピーク強度比は虚血負荷後直ちに増加し、30 分間の虚血誘導後に再灌流すると低下した。ラマンピーク強度比を計測することで心筋虚血のモニタリングが可能で、ミトコンドリアのシトクロムのレドックス変化を反映すると考えられた。

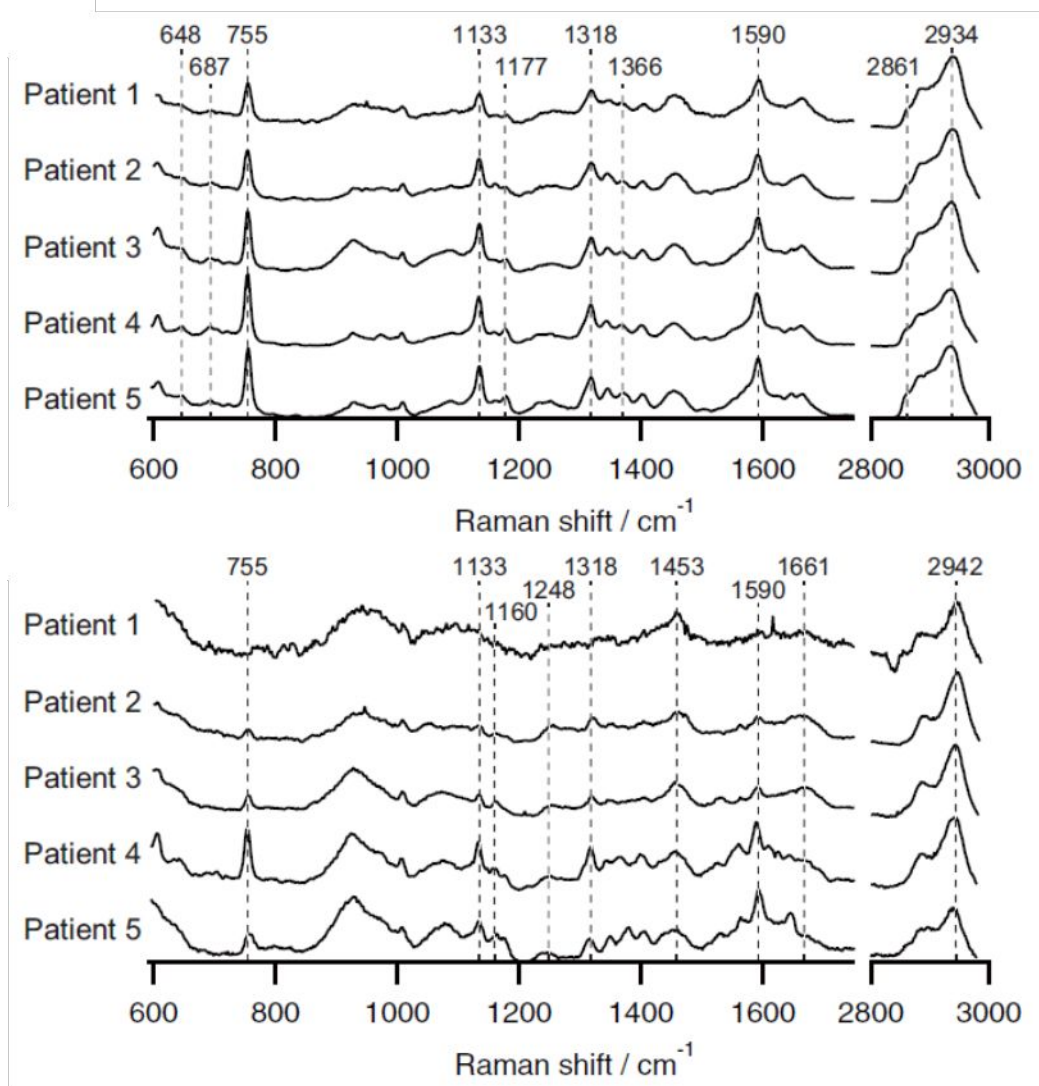
また、より長時間虚血を誘導すると、再虚血誘導時には還元型シトクロムを反映するラマンピーク強度比はあまり増加しなかった。これはミトコンドリア内膜の呼吸鎖複合体機能の不可逆的障害を示唆する所見と考えられた。

また、ランゲンドルフ灌流ラット虚血心の左心室断面のラマンスペクトルも測定したが、還元型シトクロム分子由来のラマンピークの強度は虚血負荷後直ちに増加した。



(図1) ラマンスペクトル測定部位。Area1, Area2, Area3を測定。LA:左房, LV:左室, LAD:冠動脈左前下降枝, PA:肺動脈, RV:右室

虚血性心疾患（慢性期）における特徴的なラマンスペクトルの探索について、手術で切除された陳旧性心筋梗塞巣を用いて解析を行った。すなわち、患者の同意を得た症例について非染色薄切切片を作製し、ラマンスペクトル計測を行った。図2に示すように、心筋細胞から構成される非梗塞巣は、 $755, 1133, 1318, 1590\text{ cm}^{-1}$  に4つのピークを有し、還元型シトクロムのピークと一致した。一方、陳旧性梗塞巣のラマンスペクトルは、患者間で変動が大きかったが  $2942\text{ cm}^{-1}$  にピークを有し、これは非梗塞巣における  $2934\text{ cm}^{-1}$  のピークとは異なっていた。



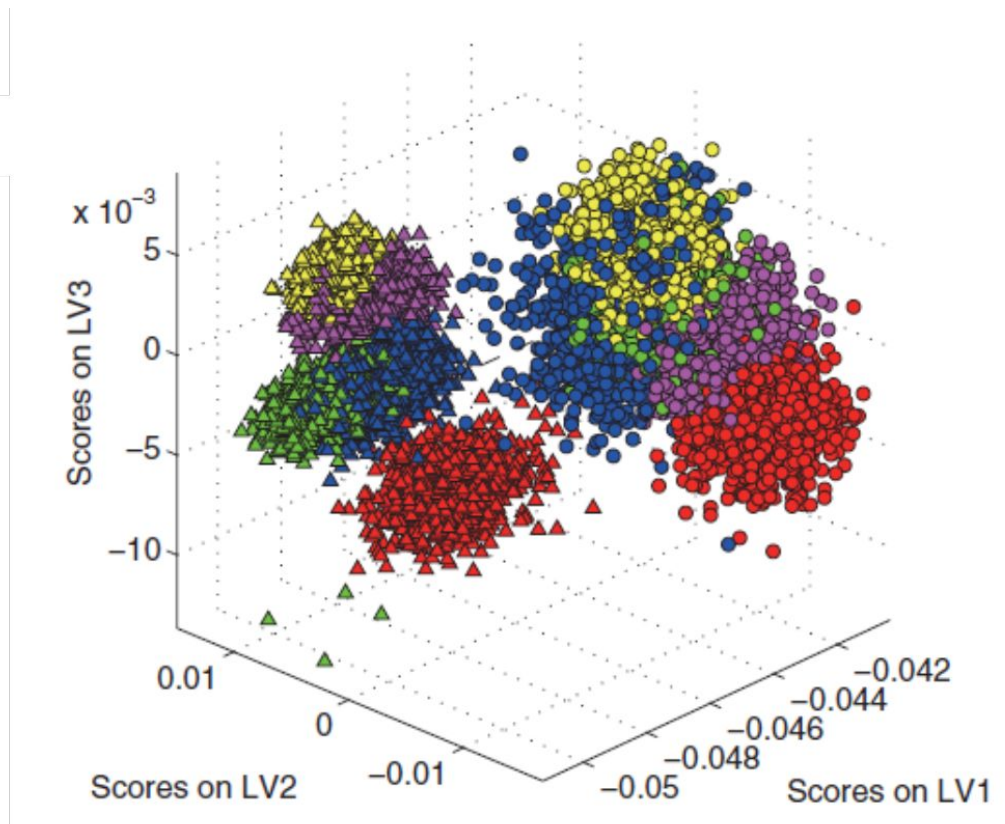
(図2) 陳旧性心筋梗塞境界域のラマンスペクトル。非梗塞巣(上段)および陳旧性梗塞巣(下段)のラマンスペクトルを示す。(Sci Rep 2018)

1248、1453、1661、2942  $\text{cm}^{-1}$  のスペクトル形状は、陳旧性梗塞巣の成分である型コラーゲンのスペクトル形状とほぼ同一で、ヒトとラット心臓のラマンスペクトルは類似していた。また、健常心筋、線維化組織を細胞レベルでラマンイメージングすることも可能であった(レーザー研究 2019;47:99, Sci Rep. 2018;8:14671)。図3に陳旧性梗塞巣と非梗塞巣のラマンスペクトルを部分的最小二乗判別分析した結果を示す。陳旧性梗塞巣と非梗塞巣は99.9%の精度で検出できた(Table 1)。

Table 1

	Histology	
	Non-infarcted	Infarcted
Non-infarcted	4999	4
Infarcted	1	4996
Sensitivity	99.98%	99.92%

(Sci Rep 2018)



(図3) 非梗塞巣および陳旧性梗塞巣の部分的最小二乗判別分析。LV1 (Latent variable 1), LV2およびLV3のスコアプロット。三角:非梗塞巣。円:陳旧性梗塞巣。赤:患者1。緑色:患者2。青:患者3。黄色:患者4。ラマンスペクトルに対するLV1 (b), LV2 (c), LV3 (d)の寄与は、それぞれ78.65%, 2.56%, 0.41%。(Sci Rep 2018)

以上の結果と以前の研究結果 (Biochem Biophys Res Commun. 2009;382:370、Anal Chem. 2014;86:6903) を併せて考えると、超急性期～慢性期の虚血心においてラマンスペクトル (特にシトクロムのラマンピーク) は鋭敏に変化し、ラマン分光法により *in vivo* で心筋バイアビリティを鑑別できる可能性があると考えられた。ただし、心臓組織のラマン散乱分光を体内で行う場合、血液のラマン光強度が強く、比較的強度の弱い心筋細胞由来のラマン光に影響を及ぼすため、多彩な病変を血液の存在下で正確に鑑別するには更なる研究が必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

橋本 剛佑、原田 義規、熊本 康昭、高松 哲郎、田中 秀央 「ラマン分光法による生体組織・細胞解析とその可能性」**レーザー研究** 2019;47:99 - 102 査読有

Kumamoto Y、Harada Y、Takamatsu T、Tanaka H. "Label-free Molecular Imaging and Analysis by Raman Spectroscopy." **Acta Histochem Cytochem** 2018;51:101-110 査読有

Yamamoto T、Minamikawa T、Harada Y、Yamaoka Y、Tanaka H、Yaku H、Takamatsu T. "Label-free Evaluation of Myocardial Infarct in Surgically Excised Ventricular Myocardium by Raman Spectroscopy." **Sci Rep** 2018;8:14671 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

原田義規、高松哲郎、田中秀央「ラマン顕微鏡による生体組織解析」**レーザー学会学術講演会第38回年次大会シンポジウム** 2018年

原田義規、高松哲郎、田中秀央「心筋梗塞巣のラマン分光分析」**第15回 医用分光学会(招待講演)** 2017年

Harada Y、Takamatsu T、Tanaka H "Analysis of living cells and tissues by label-free microscopy" **第12回中日組織細胞化学合同セミナー (国際学会)** 2017年

〔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 <http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pcr/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：熊本 康昭

ローマ字氏名：Kumamoto Yasuaki

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：・医学(系)研究科(研究院)

職名：助教

研究者番号(8桁): 30611727

### (2)研究協力者

なし