

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18444

研究課題名（和文）分子キラリティを疾患プローブとしたin vivoラマン生体モニタリング

研究課題名（英文）In-vivo Raman monitoring using molecular chirality as a diagnostic probe

研究代表者

加納 英明（Hideaki, Kano）

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：70334240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、非線形光学効果によるD-体のアミノ酸(D-amino acid;DAA)検出を目指して、ヒト水晶体の測定を行った。本測定では、第三高調波発生チャンネルで特徴的な信号を検出したCARSスペクトル解析を行ったところ、特異なラマンバンドを検出した。これらの結果は、D-体のアミノ酸も関連する白内障に関係するタンパク質凝集体を検出した可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴いD-体のアミノ酸(D-amino acid;DAA)が体内で出現することが報告されているので、本研究により検出が示唆されたタンパク質凝集体の解析を続けることで、各種の加齢性疾患の初期兆候を検出することが出来る可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Proteins in our body are composed of L-amino acids. However, in recent years, it has been reported that D-amino acid (DAA) appears and accumulates in the body with aging, which causes various age-related diseases. In this study, the human lens was measured with the aim of detecting DAA by coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS). In addition to CARS, our apparatus can simultaneously detect other nonlinear optical effects such as harmonic generation. In the present study, a characteristic signal was detected in the third harmonic generation (THG) channel. Based on spectral analysis, several unique Raman bands were detected. These results suggest that protein aggregates associated with cataract due to DAA could have been detected.

研究分野：分子分光学

キーワード：ラマン CARS キラリティ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々の体を構成するタンパク質は L-体のアミノ酸から構成されている。しかし近年、加齢に伴い D-体のアミノ酸(D-amino acid;DAA)が体内で出現することが報告され、その増加と蓄積がタンパク質の高次構造や機能に変化をもたらすことで、最終的に各種の加齢性疾患が引き起こされることが分かってきた。そこで本研究では、ラマン分光の技術を高度化することで、生体内の DAA がきっかけとなって生じる各種疾患の初期状態を非破壊・非侵襲にて生体から直接分光検出できる、全く新しい装置の開発を目標とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、代謝が遅く DAA が蓄積しやすい水晶体にターゲットを絞り、Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)を用いることで、DAA 量を非破壊・非侵襲にて生体から直接分光検出できる、全く新しい装置の開発を研究の目的とした。これにより、老化と加齢性疾患を DAA という定量的指標で診断可能とし、実年齢とは異なる身体の真の「老化年齢」の定量を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、生体組織の様々な分子情報を非破壊・低侵襲・非標識・非染色にてそのまま高速取得できるマルチカラーCARS を高度化することで、生体組織のラベルフリーイメージングを実現できる装置開発を行った。

CARS 過程では一般に二色のレーザー光 ( $\omega_1$ 、 $\omega_2$  光、またはポンプ光、ストークス光)を用いる。これら二つの入射光の角振動数差 $\omega_1-\omega_2$  が試料分子の持つ振動モードの角振動数 $\Omega$ と一致すると ( $\omega_1-\omega_2=\Omega$ )、レーザー照射された多数の試料分子の振動モードが共鳴励振される。このようにして生じた振動コヒーレンスは、試料分子が三つ目のレーザー光 ( $\omega_3$  光、またはプローブ光) と相互作用することにより、角振動数 $\omega_3+\Omega$ の三次の非線形分極に変換され、その分極からの光電場発生により、 $\omega_{\text{CARS}} (= \omega_3 + \Omega$  光 (CARS 光)) として取り出される。エネルギー保存則から、 $\omega_{\text{CARS}} = \omega_1 - \omega_2 + \omega_3$  であることが要請される。また、位相整合条件から CARS 光は  $k_{\text{CARS}} = k_1 - k_2 + k_3$  の方向に発生する。ここで、 $k_x$  は  $\omega_x$  光の波数ベクトルである。 $\omega_3$  光として、通常はすでに入力済みの  $\omega_1$  光が使われる。その場合 ( $\omega_3 = \omega_1$ )、 $\omega_{\text{CARS}}$  光の信号強度は  $\omega_1$  光及び  $\omega_2$  光の強度の二乗及び一乗にそれぞれ比例する。すなわち、CARS 光の信号強度は  $\omega_1$  光の強度に対して非線形に増大する。また、位相整合条件から、入射レーザーの進行方向に指向性のよい CARS 光 (前方散乱) を得ることができる。このように、信号光をコヒーレントかつ非線形に増幅することができるため、高速イメージングが可能になる。この過程をコヒーレント白色光 (白色レーザー) を用いて駆動すると、複数の振動モードを同時に励振して信号取得するマルチプレックス CARS 分光イメージングが実現できる。

### 4. 研究成果

研究代表者は、本研究でコアテクノロジーとなるマルチカラーCARS イメージングで用いる白色パルスレーザーの開発をフランスの研究者と共に 2008 年からスタートさせている。これに加え、研究代表者は国内企業(ニコン)との産学連携を 2011 年から開始し、CARS をはじめ各種非線形光学効果に最適化されたカスタムメイド顕微鏡の構築を進めた実績がある。本研究でも、日仏の国際共同研究、及び国内企業との効率的な産学連携により、本研究で新規光源を用いたマルチモード非線形光学 CARS 分光イメージングシステムを立ち上げた。図 1 に実験装置図を示す。光源はマスター

発振器ファイバー増幅器 (master oscillator fiber amplifier; MOFA) 構成を取っている (Leukos: SM-1000)。マスター発振器には cw Q-スイッチ・マイクロチップ Nd:YVO<sub>4</sub> レーザーを、ファイバー増幅器は Yb 添加ファイバーを採用している。最終的な光源仕様は、中心波長、パルス幅、繰り返し周波数、平均出力がそれぞれ 1064 nm、~85 ps、~0.82 MHz、~2 W である。発振器から

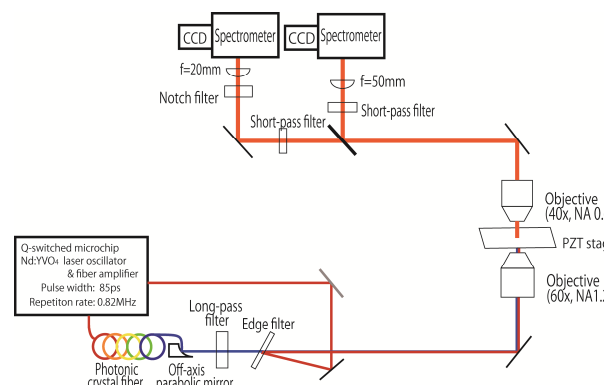


図 1. マルチモード非線形光学 CARS 分光イメージングシステム

の出力の一部を PCF に通すことで広帯域 SC 光を発生させ、ストークス光 ( $\omega_2$  光) とした。一方、残りの基本波 (1064 nm) を従来通りポンプ光 ( $\omega_1$  光) とした。ポンプ光、ストークス光のパルスエネルギーはそれぞれ約 2 及び 1  $\mu$ J であり、これは約 24 及び 12 kW の尖頭出力に対応する。

本装置を用いて DAA 測定を行うための準備として、キラル分子の測定を行い、CARS によるキラル識別が可能か検証を行った。テストサンプルとして、キラルカラムの充填剤として汎用されているトリスフェニルカルバメートセルローズ(CPC)を対象とした。CPC は世界中のキラル分離市場で最も実用的な充填剤となっているが、キラル分離のメカニズムについては十分明らかにはなっていない。キラルカラム充填剤である CPC と光学活性体の間に可逆的な相互作用があると推測されるが、両者の相互作用を直接評価した例はない。したがって、本研究で得られる知見は、CARS によるキラル識別という当初目標に加え、将来の優れたキラル充填剤の開発にもつながることが期待される。*N*-カルボベンゾキシバリンの光学異性体を含有する CPC を測定試料として CARS 測定を行ったところ、光学異性体の片側のみ、CPC 中に多く残存していることがマルチプレックス CARS スペクトルから明らかになった。これに加え、CPC 由来のバンドを解析したところ、残存量の多い CPC ほどブルーシフトするバンドがあることを見出した。以上の結果から、開発した装置による CARS スペクトル解析により、キラル化合物の識別に関する知見が得られた。

次に、DAA の CARS による検出を目指して、水晶体の測定を行った。水晶体は 3 種類の水晶体タンパク質、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -クリスタリンの超分子的構築により高い透明度が実現されることが知られているが、老化など様々な要因によって起こるタンパク質構造変化が白内障等の疾患としてあらわれ、水晶体の白濁化を引き起こす。そこで本研究では、まず、白内障発症前に生じると考えられているタンパク質凝集体の検出を目指した。サンプルはヒト水晶体をすりつぶした液体状のものであり、研究分担者から提供頂いた。水晶体サンプルはスライドガラス及びカバーガラスで挟んで封入し、プレパラートとした。

水晶体サンプルの光軸方向断面像を図 2 に示す(測定視野:縦 x 横 200x100 $\mu$ m<sup>2</sup>)。実験で得られた CARS スペクトルを自発ラマンスペクトルに対応する  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトルに変換したのち、2930  $\text{cm}^{-1}$  のバンドにおけるイメージを作成したものが図 2(a)である。本装置では、CARS に加えて他の非線形光学効果も同時に発生・検出することができる。本測定では、第三高調波発生(third harmonic generation; THG)のチャンネルでも特徴的な信号を検出した。図 2(b)に結果を示す。タンパク質全体を可視化する 2930  $\text{cm}^{-1}$  の CARS イメージではほぼ一樣なタンパク質分布が得られたのに対して、図 2(b)の THG イメージでは空間的に局在した信号を検出した。この中の一部の平均

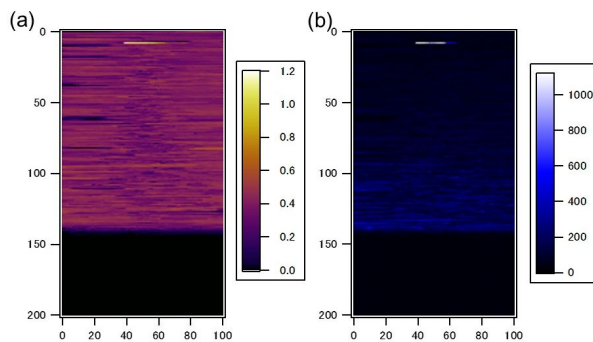


図 2(a) CARS イメージ (2930  $\text{cm}^{-1}$ ) 及び (b) THG イメージ

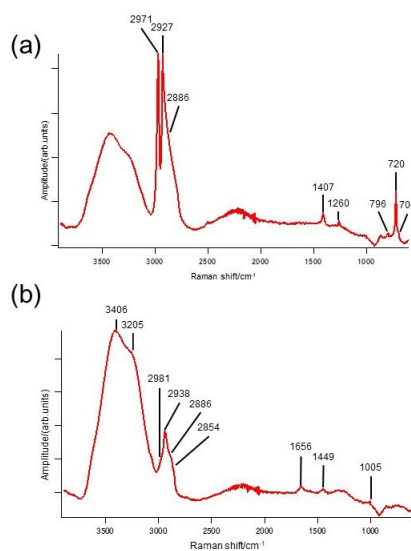


図 3(a) THG 信号が検出された位置の  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトル及び (b) 視野内平均  $\text{Im}[\chi^{(3)}]$  スペクトル

スペクトルを図 3(a)に示す。サンプル全体を平均したスペクトル(図 3(b))と比べ、 $2971\text{ cm}^{-1}$ 、 $2927\text{ cm}^{-1}$ 、 $720\text{ cm}^{-1}$ 等の位置にバンドが観測された。これらの結果は、白内障に関するタンパク質凝集体を検出した可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hideaki Kano
2. 発表標題 CARS microscopy under supercontinuum illumination and its application to living cell/tissue imaging
3. 学会等名 SciX 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Kano
2. 発表標題 Advances in CARS spectroscopy and imaging using a supercontinuum light source
3. 学会等名 The 26th International Conference on Raman Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideaki Kano
2. 発表標題 Ultra-Multiplex CARS Microspectroscopy Using a Supercontinuum Light Source
3. 学会等名 Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy (TISRS 2019) (招待講演) (国際学会) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納 英明
2. 発表標題 生細胞・生体組織を染めずに見る～コヒーレントラマン分光によるラベルフリー・マルチカラーイメージング～
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会 (招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

加納研究室  
<http://www.bk.tsukuba.ac.jp/~CARS/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤井 紀子  (Fujii Noriko)  (90199290)	京都大学・複合原子力科学研究所・寄附研究部門教員    (14301)	