

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02744

研究課題名(和文) ラマン分光を用いた非侵襲生細胞温度分布可視化法の開発

研究課題名(英文) Development of a non-invasive cellular thermometer using Raman spectroscopy

研究代表者

島田 林太郎 (Shimada, Rintaro)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：70548940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラマン分光を基盤技術として用い、細胞内部の物質分布や温度分布を非染色で可視化する新しい分光顕微鏡の開発を目的として研究を行った。これまで細胞観察においてはほとんど利用されていなかった低波数スペクトル領域を高速に観測できる新規顕微イメージング装置を開発し、拡張された測定領域から得られたラマン信号を用いて細胞内のタンパク質、脂質、水などの分布を可視化可能なことを示した。さらに信号解析に係るノイズ低減処理法を開発し、温度計測や物質分布解析の精度向上を達成した。開発した装置を用いて、生細胞の温度分布イメージングを行い、細胞内部に温度の不均一性が存在することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではラマン分光を基盤技術として用い、細胞内部の物質分布や温度分布を非染色で可視化する新しい分光顕微鏡の開発を目的として研究を行った。本研究で開発した装置は細胞内化学環境を侵襲することなく温度計測を行う新たな方法論を提供するものであり、細胞機能や細胞活性の評価に利用可能であると期待される。

研究成果の概要(英文)：The present research was conducted to develop a new microscope that uses Raman spectroscopy to visualize the distribution of substances and temperature inside cells without staining or tagging. We developed a novel microscopic imaging system capable of high-speed observation of Raman scattering over a wide (-2000 to +2000 cm⁻¹) spectral range. Using the low-frequency Raman signal, we visualized the distribution of proteins, lipids, and water inside living cells. Furthermore, we developed a new noise reduction technique for signal analysis. Using the forged instrument, we performed temperature distribution imaging of living cells and obtained results suggesting the existence of temperature inhomogeneity inside the cells.

研究分野：分子分光学

キーワード：ラマン分光 温度計測 多変量解析

1. 研究開始当初の背景

化学反応において温度は反応性を支配する基本的な要素の一つである。細胞内というミクロスケールの化学環境においても温度が細胞機能と能動的あるいは受動的に深く関与していると考えられる。近年、生細胞内部の局所的な温度分布を測定・画像化できる試薬が相次いで開発され、細胞内部においても温度が均一ではなく、細胞内小器官ごとに異なる温度分布が存在することが示唆された。しかしながら、既存の細胞内部温度可視化手法は主に外部から加えたプローブ分子由来の蛍光信号を利用した計測法であり、プローブの使用に付随する多くの問題点(検量線の信頼性、種々の細胞への応用性、プローブによる細胞への侵襲性、生体分子ではなくプローブの温度を計測、など)が存在する。光学解像度でプローブ分子を用いずに細胞内温度分布が可視化できる技術開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

生体分子そのものから発生するラマン散乱光をもとに、プローブ分子などを用いず非侵襲的に細胞内物質の温度を直接計測する新たな細胞内部温度可視化手法の開発を目的として研究を行なった。信号源として水やタンパク質など細胞内外に豊富に存在する分子を利用できるため、細胞や組織の種類によらず、あるいは細胞の内外を問わず信号計測が可能であると考えられる。細胞の種類の違いによる温度感受性の差や、組織内での個々の細胞の温度分布をも統一的に検証・比較できるプラットフォームの構築を目標とした。また、ラマン散乱スペクトルは分子構造や分子の存在量に関する情報も与えるため、温度計測と同時に計測位置における分子種分布やその分子環境(細胞小器官の種別など)を同定し、細胞内の分子・細胞小器官の構造・分布と温度の関連を直接調べることにより、熱産生の分子機構や熱刺激に対する分子応答の機構に関する新たな分析手法を提供することを目指した。

3. 研究の方法

ラマン散乱には、分子が光からエネルギーを奪う「ストークス散乱(S)」と、逆に光にエネルギーを与える「アンチストークス散乱(AS)」の二種類があり、それらの信号強度比は、対象物の絶対温度のみをパラメータとしたボルツマン分布関数に従うことが知られている。温度とラマン信号強度比は1対1で対応するため、細胞中の局所部位からストークスおよびアンチストークス散乱を同時に観測しその比を求めることで、対象物質そのものの絶対温度を検量線を用いることなく定量する。このため、生細胞など時間的に不安定な試料において蛍光などによる背景光の妨害を低減し、ラマン信号のみを原理的に定量する励起波長高速変調ラマン分光法を開発し、これとASおよびSラマン散乱同時に高速に取得する多点並列検出広帯域ラマン顕微分光計を組み合わせることで温度分布画像計測を行う新たな顕微分光計測技術を開発した。

4. 研究成果

(1) 並列化シフト励起差ラマン分光法(P-SERDS)の開発とその多変量ラマンデータ解析への有効性の検証

ラマン信号強度の原理的な定量を行うために、時間的に変化する試料においても、効率的にラマン信号と蛍光信号を分離する手法を開発した(図1(a))。開発した装置は、標準的な共焦点ラマン顕微分光装置の励起光波長を高速(0.1 kHz)変調し、発生した蛍光を含むラマン散乱光を共焦点ピンホールを通過した後、ガルバノミラーを用いて分光器に導入。このとき、信号光の行路をレーザー変調周波数と同期して変調し(図1(b))、異なる波長で励起された信号光をCCD検出器上の異なる素子に記録する(図1(c))ことで変調周波数と独立に長時間の積算を実現した。

原理実証として、光合成を行う珪藻類など背景蛍光信号の比較的強い生物試料に対して本手法を用いることで、蛍光-ラマン信号の客観的かつ原理的な信号分離が可能であることを示した。強い蛍光褪色が発生する時間的に不定な試料における蛍光除去能を従来法(多項式近似による除算)と比較し、特に本方式が多変量解析において効果

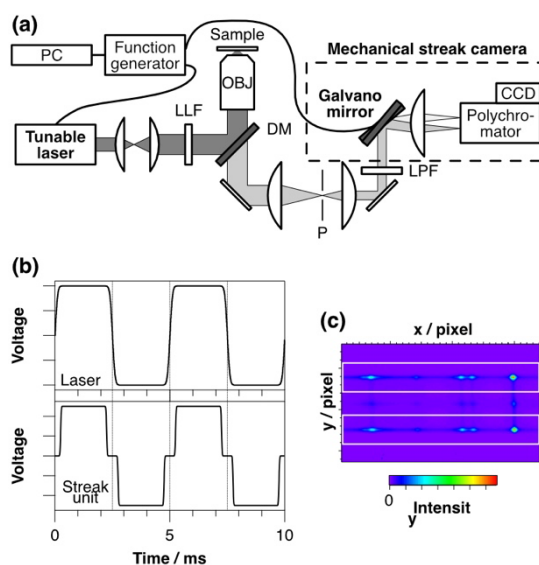


図1 (a) 開発した P-SERDS 装置図 (b) レーザー波長変調とガルバノミラー変調の入力電圧波形 (c) 1 回の P-SERDS 露光後に CCD 検出器の二次元画素上に蓄積された信号

的に蛍光を排除できることを示した。(図2)

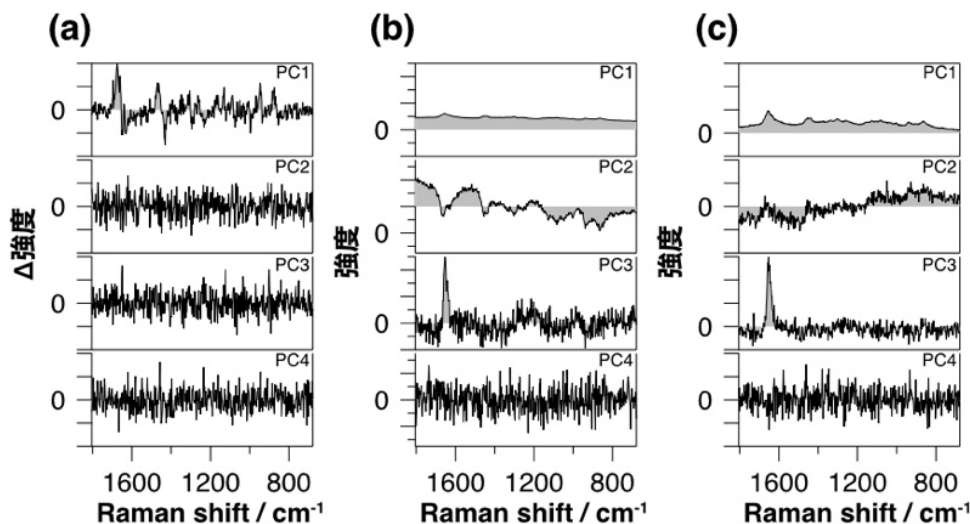


図2 単一細胞から得られた蛍光の時間変化を含むタイムラプスデータセットをそれぞれ(a) P-SERDS (b) 生データ (c) 3次多項式減算したのち、主成分分析 (PCA) を行なった結果。P-SERDS では蛍光信号由来の主成分が効果的に排除されている。

(2) 温度分布可視化顕微分光計の開発

次に、細胞内部温度可視化を実現するための顕微イメージング装置の開発を行なった。AS-S比を用いた温度計測には精密なスペクトル測定が必須である。この目的のために、光信号伝送の歪みの少ない、本測定に最適な分光器を選定、導入した。さらに、特殊な光学フィルター(体積ブラッグ回折格子フィルター)を装置に加え、装置測定領域を短波長領域まで拡張することにより±20から±2000 cm^{-1} の広帯域においてASおよびSラマン散乱の同時測定を実現した。構築したプロトタイプ装置を用いて培養細胞に適用したところ、低波数領域(+200から+20 cm^{-1} 領域)では、従来法で観測されていた指紋領域(+2000から+200 cm^{-1})に比べて1桁ほど強いラマン信号が観測されることを明らかにした。(図3)

さらに、本装置に波長が0.60 nm (20 cm^{-1})異なる2本の励起レーザーを導入し、これらによる試料への光照射のON/OFFを光チョッパーにより高速に切り替えることにより、P-SERDSを適用した顕微イメージング装置を構築した。

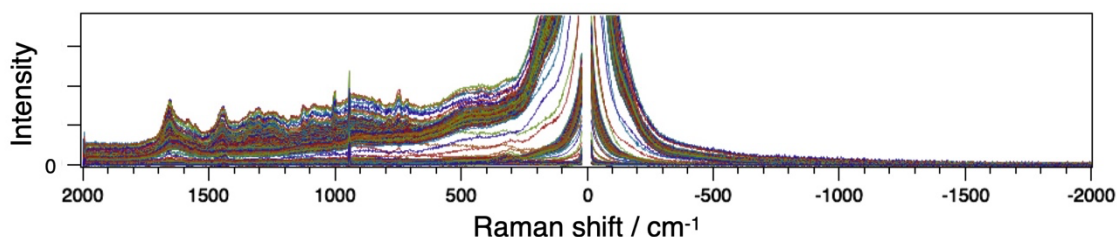


図3 ヒト乳腺がん細胞の指紋領域と低波数領域のラマンスペクトル

(3) 生細胞の低波数ラマンイメージングと温度画像計測

本装置を用い、顕微鏡下で培養環境(摂氏37度)に保った培養細胞(ヒト乳腺がん組織由来)のラマンイメージを行った。低波数領域の信号は、指紋領域(+2000から+200 cm^{-1})に比べて1桁ほど強いラマン信号が観測されたものの明瞭なピークを示さなかった。ブロードな低波数のラマン信号に主成分分析と独立成分分析を組み合わせた多変量解析を適用することにより、タンパク質、脂質、水などに由来する信号が含まれていること、また、これらの半自動的な成分分離解析が可能であることを明らかにした。指紋領域において観測されるタンパク質、脂質、水などの信号との比較により、以下に挙げるような細胞の低波数ラマンスペクトルの特徴を見出した。(i) 水に帰属される低波数ラマン信号は、液相における水分子の水素結合ネットワークに由来するバンド構造(53 cm^{-1} および175 cm^{-1})を示した。さらに、このピーク位置や強度について、細胞内外で大きな違いが見られないことを明らかにした。これは、細胞基質においても通常の電解質水溶液(培養液など)に見られる水素結合ネットワークが維持されていることを示唆している。(ii) タンパク質に由来する信号が複数観測された。特に76 cm^{-1} に観測されたピークはタンパク質のペプチド骨格由来の束縛回転振動であると考えられるため、タンパクの構成アミノ酸によらないペプチド量を表す信号と見做しうる。

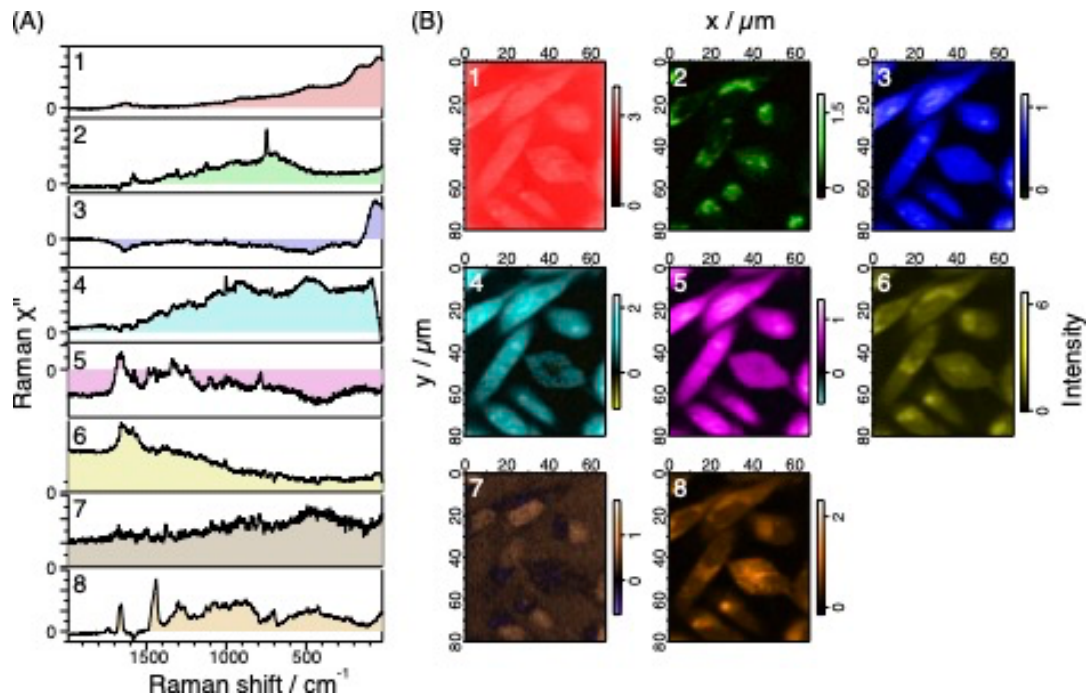


図4 ヒト乳がん細胞の広帯域ラマンイメージングによる (A) スペクトル成分と (B) その空間分布。成分1は水、2,6はシトクロム、3,4,5はタンパク質、7は核酸、8は脂質に帰属。

本装置を用いて、顕微鏡下で摂氏 37 度に保った培養細胞（ヒト乳がん組織由来）の AS-S ラマン信号比から細胞内の局所温度を可視化した結果を図5に示す。細胞外緩衝液は均一な温度が示された一方、細胞内には 5 度ほど周囲より温度の高い部位が局在する様子が可視化された。細胞の自家蛍光に由来する妨害信号の影響を精査する必要はあるものの、本結果は、非侵襲的に細胞内物質の温度を直接計測する新たな細胞内部温度可視化手法の可能性を示すものである。

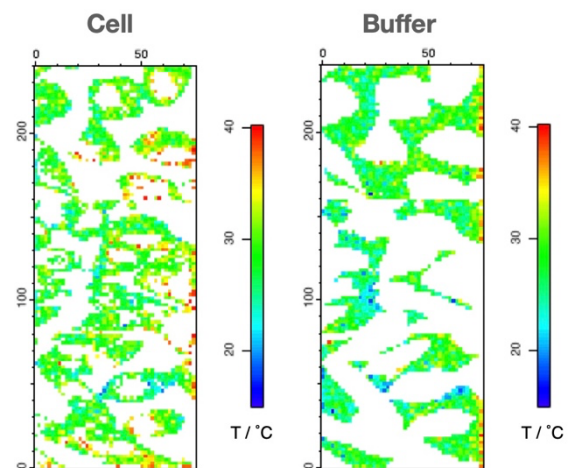


図5 ラマン信号に基づく細胞（左）内（右）外の温度分布可視化像

(4) 多変量信号解析に係るノイズ低減処理法を開発

大規模スペクトルデータのノイズ低減前処理で用いられる特異値分解や主成分分析は入力データが数千～万スペクトル以上の巨大データでは、ノイズ成分と信号成分の混合が促進され、ノイズ除去能が頭打ちになることが明らかになった。これは、ラマン散乱に付随するショットノイズが内在的に信号強度と相関を持ったためだと考えられる。そこで、ラマンスペクトルデータの信号強度を、一般化アンスコム変換によって分散安定化し、変換後のデータの特異値分解することでノイズ分離を行う新規ノイズ低減処理法を開発した。この結果、入力データの増加に伴い、ほぼ単調にノイズ除去能を向上させることを実現した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takei Yuki, Hirai Rie, Fukuda Aya, Miyazaki Shinichi, Shimada Rintaro, Okamatsu-Ogura Yuko, Saito Masayuki, Leproux Philippe, Hisatake Koji, Kano Hideaki	4. 巻 155
2. 論文標題 Visualization of intracellular lipid metabolism in brown adipocytes by time-lapse ultra-multiplex CARS microspectroscopy with an onstage incubator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 125102 ~ 125102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0063250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Rintaro, Nakamura Takashi, Ozawa Takeaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Parallelized shifted excitation Raman difference spectroscopy for fluorescence rejection in a temporary varying system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biophotonics	6. 最初と最後の頁 e201960028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbio.201960028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takamura Ayari, Watanabe Daisuke, Shimada Rintaro, Ozawa Takeaki	4. 巻 2
2. 論文標題 Comprehensive modeling of bloodstain aging by multivariate Raman spectral resolution with kinetics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-019-0217-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 島田 林太郎
2. 発表標題 メカニカルストリークカメラを用いた 高速広帯域顕微ラマンイメージング
3. 学会等名 日本分光学会生細胞分光部会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田 林太郎
2. 発表標題 独立成分分析による多変量ラマン信号成分分解の検討
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rintaro Shimada, Takeaki Ozawa
2. 発表標題 Mining Large Raman Spectroscopic Data Beyond the Shot Noise Limit
3. 学会等名 Asian Spectroscopy Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田林太郎、小澤岳昌
2. 発表標題 メカニカルストリークカメラを用いた顕微ラマン分光計
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田林太郎, 小澤岳昌
2. 発表標題 大規模ラマンハイパースペクトルデータの生物応用にむけて
3. 学会等名 分光学会生細胞分光部会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada, Rintaro; Chiu, Liang-da; Ozawa, Takeaki,
2. 発表標題 Raman Microscopy with a Mechanical Streak Camera
3. 学会等名 International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田林太郎, 小澤岳昌
2. 発表標題 分散安定化によるラマンハイパースペクトルデータの行列分解成分数の改善
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関