

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04443

研究課題名(和文) 生体光センシング技術への応用を目指した磁気共鳴ラマン分光法の新規研究開発

研究課題名(英文) Development of magnetic resonance Raman spectrometry for application of optical technology to living body

研究代表者

高成 広起 (TAKANARI, Hiroki)

徳島大学・ポストLEDフォトンクス研究所・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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：PVAハイドロゲルやオレイン酸などの標準試料に対して、静磁場と、それに直交する様々な周波数の交流磁場を加えた。C-C結合のスペクトルでは交流磁場の周波性に依存してラマン散乱光の増強と一部ピークシフト、またメチル基・メチレン基のC-H結合に由来するスペクトルでは特定周波数の交流磁場によるラマン散乱光の減高とピークシフトなどの複数のスペクトル変化を認めた。このことから、ラマンスペクトルを磁場によって修飾できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PVAハイドロゲルやオレイン酸などのサンプルで、C-C結合やC-H結合に由来するラマンスペクトルが磁場により変化することが示された。これらの分子結合は生体にも豊富に存在することから、生体試料でも本手法が応用できる可能性が示された。但し、生体にはC-C結合やC-H結合をもつ物質は多彩で、物質の判別にはより多彩な分子結合の磁場に対する影響を検証し、ライブラリ化する必要がある。逆に、これらの情報がライブラリ化されれば、非破壊で質量分析が可能なシステム、磁気共鳴ラマン質量分析法(MR-Raman MS)の概念が確立できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Static magnetic fields and alternating magnetic fields of various frequencies orthogonal to each other were applied to standard samples such as PVA hydrogel and oleic acid. In the spectrum of C-C bond, there were multiple spectral changes such as enhancement of Raman scattering light and partial peak shift depending on the frequency of AC magnetic field. We also found multiple spectral changes such as reduction of Raman scattering light and peak shift by specific frequency of AC magnetic field in the spectrum derived from C-H bond of methyl/methylene group. These results indicated the possibility that the Raman spectra could be modified by magnetic fields.

研究分野：生体医工学

キーワード：ラマン分光分析 磁気共鳴

1. 研究開始当初の背景

レーザーをサンプルに照射すると、照射光と同じ波長のレイリー散乱光と、照射光とは異なる波長を持つラマン散乱光が発生する。照射光からラマン散乱光の波長(波数)遷移はサンプルを構成する分子の振動に依存するために、ラマン散乱光のスペクトルを分析することでサンプルの分子組成を推定できる(ラマン分光分析)。これまでラマン分光分析は、専ら構成分子の種類が比較的少ない工業分野において物性分析に用いられてきたが、分光器の小型化・高性能化に伴って精密な分光分析が可能となり、近年ではラマン分光分析を生体に応用する試みが進んでいる。

ラマン分光分析はサンプルの特別な準備を必要とせず、生体にレーザーを直接照射することで非破壊分析が可能であることから、生体にラマン分光分析を応用するメリットは大きい。正常組織と病変とでは物質の組成が異なることが多く、この違いをラマン分光分析で検出することができれば、非侵襲・低侵襲の診断手法としてラマン分光分析の応用が一気に進む可能性がある。しかし一方で、夾雑物が多い生体のラマン分光スペクトルは非常に複雑であり、個々の分子に由来するスペクトルは極めて微弱であるため、現時点でラマン分光分析による疾患の診断は方法論として未だ確立していない。現在でも生体由来のラマン散乱光をいかに高感度に捉えて、どのように分析すれば、疾患を診断できるかという研究が盛んに行われている。

現在最も進んでいるのが、ラマン散乱光を増強する各種手法の研究である。Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) はラマン散乱を発生させる励起光に加えて、分子振動に共鳴する周波数のポンプ光をサンプルに入射させ、強力なラマン散乱光を記録する手法である。光学的手法のみでラマン散乱光を増強することができるが、ポンプ光として波長可変式のパルスレーザーを必要とするなど、大掛かりな装置を必要とすることが臨床応用を阻害している。一方、Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) は金属ナノ粒子(あるいはナノ構造)によって近接場で生じるラマン散乱光の増強効果を利用する手法だが、この手法ではサンプル表面の情報は増強されるものの、サンプル全体の情報が増強される訳ではない。このため血液や尿などの液体サンプルには非常に良い適応で、高感度センサーの開発などに応用されているが、実質臓器の病変検出には向いていない。他にも偏光を上記の手法に組み合わせるなどの様々な工夫が行われているが、いまだラマン分光分析による病変検出は道半ばである。

2. 研究の目的

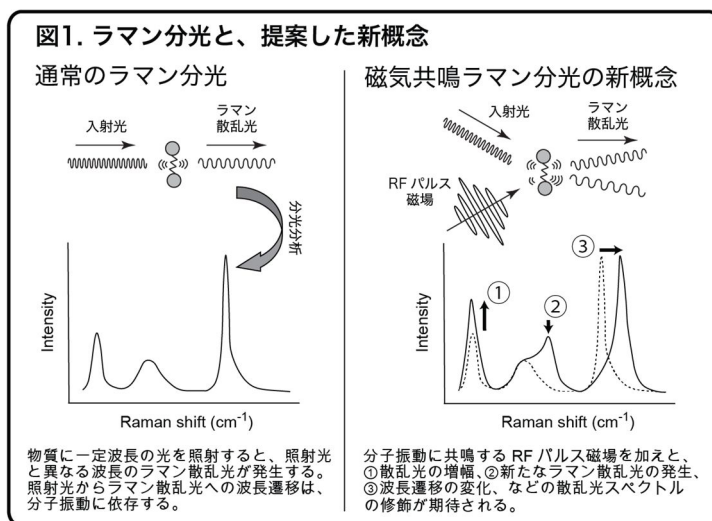
本研究では、ラマン分光分析が測定対象の分子振動を光学的に検出するという点に注目し、分子振動を外的要素によって修飾することで、特定の分子に由来するスペクトルを検出しやすくすることができると考えた。そして、外的要素として磁場を用いることを提案した。

通常のラマン分光分析では、入射光からサンプルの分子振動に依存する波長遷移を生じたラマン散乱光が発生して、そのスペクトルを記録する(図1左)。しかし雑多なスペクトルを持つ生体サンプルでは、目的とする物質がどのスペクトルに対応するかが不明なことが多い。そこで、標的物質の分子振動に共鳴する交流磁場、あるいはパルス磁場を加えることで特定の分子振動に修飾を加え、その分子振動に由来するラマンスペクトルの変化を捉えることで、サンプル中の特定の分子を検出することができるのではないかと考えた(図1右)。本研究では、この新概念である磁場によるラマンスペクトルの変化・修飾が実際に起こりうるか、また、スペクトルの変化・修飾によって特定の分子を検出するという基本概念の確認を行うことを目的とした。

そこで、標的物質の分子振動に共鳴する交流磁場、あるいはパルス磁場を加えることで特定の分子振動に修飾を加え、その分子振動に由来するラマンスペクトルの変化を捉えることで、サンプル中の特定の分子を検出することができるのではないかと考えた(図1右)。本研究では、この新概念である磁場によるラマンスペクトルの変化・修飾が実際に起こりうるか、また、スペクトルの変化・修飾によって特定の分子を検出するという基本概念の確認を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

まず我々は、磁場に影響されにくい分光分析を実現するためにファイバ型ラマン分光装置を作製した(次項図2上、ラムダビジョン社との共同開発:SF-Ram-US)。当該装置は中心波長785nm、出力400mWの連続波レーザーを光源とし、入射ファイバー(コア径400 μ m、マルチモード)からサンプルにレーザーを照射して検出ファイバー(コア径200 μ m、マルチモード)でラマン散乱光を採光し、分光分析器で分析を行う構成とした。これにより10mM程度までの濃度で標準サンプルであるリノレン酸の検出を行うことができたが、感度が不十分と考えられた。そ



ここで、ファイバ先端部分に Nikon 40 倍対物レンズ(Plan Apo λ 40X, NI = 0.95, working distance 0.25 mm) と、ラマン分光用フィルタキューブ (レーザーラインフィルタ 785 nm, ラマンダイクロイックミラー, ロングパスフィルタ 792 nm) を組み込んだラマンプローブを製作した。これにより、対物レンズを通してサンプルに対して 200 mW のレーザー照射が可能となり、リノレン酸を約 10 μ M の濃度まで検出できる感度を高めることができた。

上記ラマンプローブの対物レンズを可動式顕微鏡ステージ直下に倒立配置で固定し、450 mT のネオジウム磁石 2 個ずつを顕微鏡ステージに、サンプルを左右から挟み込むように 37 mm の距離を挟んで設置した。これにより、顕微鏡対物レンズ直上に 400 mT の静磁場を創出できた。さらに、サンプルステージを上下から 5 cm の距離で挟み込む形でヘルムホルツコイルを設置して、コイルに 60 V の電流を印加することで最大 100 mT の直交磁場を創出した (図 2 下)。さらにコイルにファンクションジェネレータ (RIGOL 社, DG4102) を接続し、最大振幅 50 mT で 1 Hz ~ 100 MHz の交流電流を印加することで静磁場に直交する交流磁場を創出することに成功した。

顕微鏡ステージ上に設置するサンプルとして、水、アルコール、オレイン酸などの標準試料に加え、PVA ハイドロゲル (ユニークメディカル社, SS-102-200AA) を用いた。このハイドロゲルはカーボン電極を備えて電圧・電流を印加することが可能で、磁場の有無によってサンプルに通電した場合に生じるラマン分光スペクトルの変化を記録できるようにした。

全ての実験は外部からの電磁波の影響を受けないよう、銅合金電磁シールドメッシュ (80 db) で作製した電磁シールド内にて行った。

4. 研究成果

まず我々は静磁場がラマンスペクトルに及ぼす影響を検証したが、水、アルコール、リノレン酸、PVA ハイドロゲルのいずれでも静磁場では有意なスペクトル変化を認めなかった。

続いて、我々は静磁場に直行する交流磁場を加えた場合の各サンプルのラマンスペクトルの変化を検証した。図 3 に、PVA ハイドロゲルに 100 Hz から 1 MHz の交流磁場を加えた時の、1,000 ~ 1,500 cm^{-1} の範囲でのラマンスペクトルの変化を示す。もともと 1,200 ~ 1,250 cm^{-1} 付近に強いピークを認めたが、このピークが交流磁場の周波数を高めるに従って低波数側に少しずつシフトしていく様子が観察された。またそれ以外でも 1,100 ~ 1,150 cm^{-1} 付近のスペクトルや 1,400 cm^{-1} 付近のスペクトルにもわずかな変化を認めた。このような各波数領域における交流磁場の周波数に対するスペクトル強度の変化を図 4 にまとめた。多くの波数領域で全体的に散乱高強度の増強を認めたが、特にピークシフトによると思われる 1,200 cm^{-1} の増高が目立った形となった。1,200 cm^{-1} 付近のピークは炭素結合 (C-C 結合) に由来すると考えられるが、この分子結合における分子振動が磁場によって増強効果が得られる可能性が考えられた。ただし、計測ごとのデータのバラツキも大きく、交流周波数に対する変化において有意差は見られたが (1 MHz で $p < 0.05$ vs. 磁場 off, $n = 3$) 波数領域ごとの有意差 (1,250 cm^{-1} で $p = 0.06$ vs. 1,200 cm^{-1} , $n = 3$) はみられなかった。このことから、これらの変化が計測条件による何らかのアーチファクト (磁場による顕微鏡ステージやレンズ位置のずれや、レーザー照射による温度変化など) である可能性も完全には除外できないとも考えられた。

図 2 実験装置

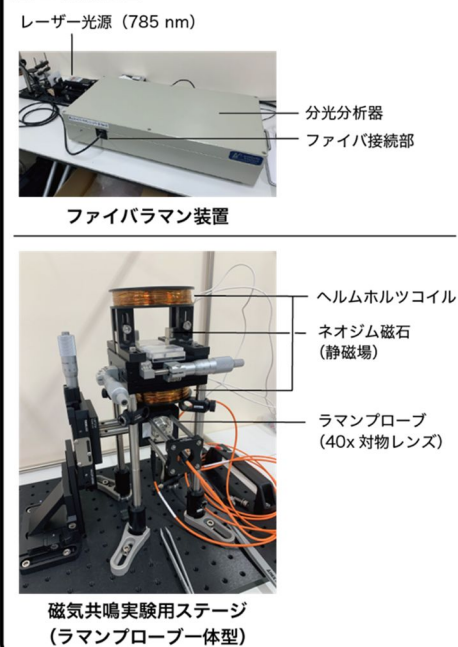
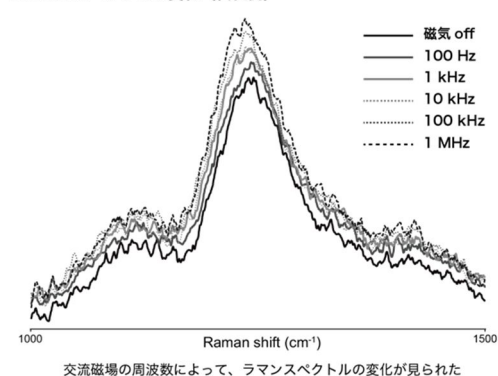
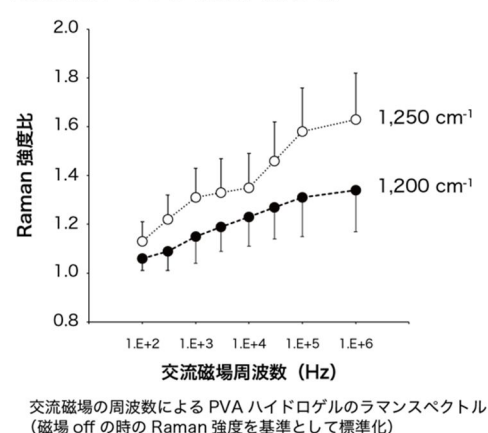


図 3. 磁気共鳴による PVA ハイドロゲルの Raman スペクトルの変化 (代表例)



交流磁場の周波数によって、ラマンスペクトルの変化が見られた

図 4. 磁気共鳴による PVA ハイドロゲルの Raman スペクトルの変化 (まとめ)

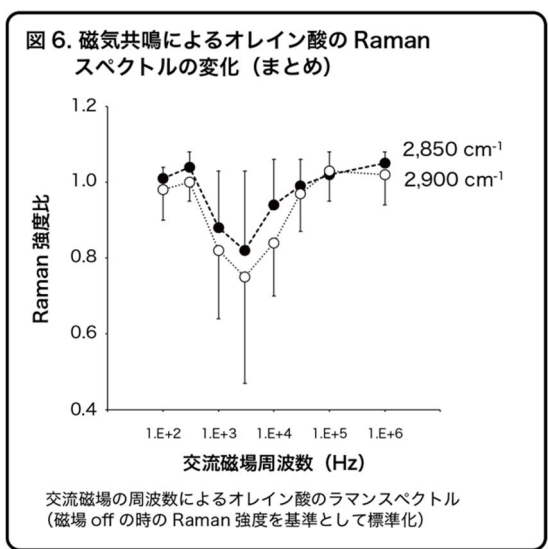
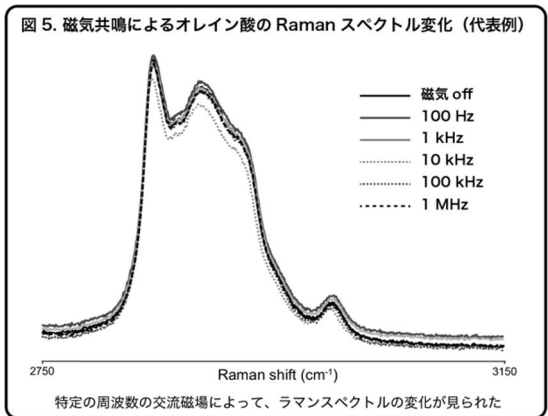


交流磁場の周波数による PVA ハイドロゲルのラマンスペクトル (磁場 off の時の Raman 強度を基準として標準化)

一方で、オレイン酸の高波数領域（ $2,750 \sim 3,150 \text{ cm}^{-1}$ ）では、PVA ハイドロゲルとはまた異なるラマンスペクトルの変化が観察された。図5にガラス底ディッシュにオレイン酸を入れて顕微鏡ステージ上に設置し、交流磁場の周波数を100 Hz から 1 MHz の範囲で変化させた時のラマンスペクトルの変化を示す。多くの周波数帯ではほとんどラマン散乱強度の変化は認めなかったが、10 kHz の交流磁場においてのみ散乱強度がわずかに低下し、ピーク位置もわずかに低波数側にシフトする所見を認めた。図6に示すように、このような変化は1~10 kHz の交流磁場を加えた時に度々観察され、当該周波数帯において他の周波数帯に比べて有意な散乱強度の低下を認めた（3 kHz で $p < 0.05$ vs. 磁場 off, $n=3$ ）。この波数領域のラマンスペクトルはメチレン基（ CH_2 ）あるいはメチル基（ CH_3 ）における炭素・水素結合（C-H 結合）に由来すると考えられる。この分子結合における分子振動は、特定の周波数帯の交流磁場に反応する可能性が示唆された。しかし、こちらも同様に波数領域間での有意差を認めなかったことから（ $2,900 \text{ cm}^{-1}$ で $p=0.07$ vs. $2,850 \text{ cm}^{-1}$, $n=3$ ）、計測手法に伴うアーチファクトの可能性は完全には否定できない状況と考えられた。

今回の研究で磁場によってラマン散乱光にある一定の変化が生じることが示された。本研究ではサンプルがPVA ハイドロゲルやオレイン酸などを用いているが、その中でもC-C 結合やメチル基・メチレン基のC-H 結合に由来するスペクトルが磁場の影響を受ける可能性が示唆されており、これらの分子結合は生体にも豊富に存在することから、生体試料においても本手法が応用できる可能性を示すものである。但し、生体にはC-C 結合やC-H 結合をもつ物質は多彩であり、これらの物質を判別するにはより多くの分子結合の、磁場に対する影響を検証し、ライブラリ化する必要がある。逆に、これらの情報がライブラリ化され、磁気共鳴ラマン分光法によって各分子結合が物質に含まれる割合を推定することが可能になれば、非破壊で質量分析が可能なシステム、すなわち磁気共鳴ラマン質量分析法（MR-Raman MS）の概念が確立できる可能性がある。

本研究でラマン散乱光が磁場によって修飾されることが示されたが、上述の通り、測定によるアーチファクトの可能性は完全に否定しきれていない。本研究のシステムでは静磁場用の永久磁石（ネオジム磁石）はステージ上に固定し、さらにソレノイドコイルを、ステージを挟み込むように固定して、静磁場に直交する交流磁場を発生させるという手技を用いた。コイルの固定が不十分な状態で実験を行った際には、コイルに通電して交流磁場を創出した瞬間にコイルが5 cm 近くずれることがあり、ステージ上でかなり強力な磁場の反発が生じていることが示唆された。以後はソレノイドコイルの固定を行った上で実験を行ったが、このような強力な磁力による顕微鏡ステージのわずかなたわみが生じた可能性、ラマンプローブに組み込んだ金属製の顕微鏡レンズ（あるいはプローブの金属製品全般）が磁場の影響を受けて光学系がわずかにずれた可能性なども考えられた。このようなネガティブな可能性を除外するために、より剛性の高い実験系、また安定した環境下で実験を繰り返す必要があると考えられた。ただし、サンプルやラマンスペクトルの波数領域、あるいは交流磁場の周波数帯によって異なる反応が見られたことから、ラマン散乱光が磁場によって何らかの影響を受けることを示す研究結果であったと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kanemura Y, Kanazawa M, Hashimoto S, Hayashi Y, Fujiwara E, Suzuki A, Ishii T, Goto M, Nozaki H, Inoue T, Takanari H.	4. 巻 147
2. 論文標題 Assessment of skin inflammation using near-infrared Raman spectroscopy combined with artificial intelligence analysis in an animal model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 2843-2850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2AN00193D	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 Li E, Loen V, van Ham WB, Kool W, van der Heyden MAG, Takanari H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Quantitative analysis of the cytoskeleton's role in inward rectifier KIR2.1 forward and backward trafficking.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.812572	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 該当する
1. 著者名 Yamazaki M, Tomii N, Tsuneyama K, Takanari H, Niwa R, Honjo H, Kodama I, Arafune T, Makita N, Sakuma I, Dobrev D, Nattel S, Tsuji Y.	4. 巻 S1547-5271
2. 論文標題 Rotors anchored by refractory islands drive Torsades de Pointes in an experimental model of electrical storm.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart Rhythm	6. 最初と最後の頁 02239-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hrthm.2021.10.012	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 該当する
1. 著者名 Minamikawa T, Ichimura-Shimizu M, Takanari H, Morimoto Y, Shiomi R, Tanioka H, Hase E, Yasui T, Tsuneyama K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Molecular imaging analysis of microvesicular and macrovesicular lipid droplet in non-alcoholic fatty liver disease by Raman microscopy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18548-18548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75604-6.	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 Hase E, Takanari H, Hoshi K, Okamoto M, Tabata A, Nagamune H, Minamikawa T, Yasui T, Yoshida Y, Minagawa K, Imada Y, Kawamura Y, Yagishita F.	4. 巻 18
2. 論文標題 Two- and three-photon excitable blue fluorescent quaternized imidazo[1,2-a]pyridines for mitochondrial imaging and potent cancer therapy agent.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 7571-7576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ob01585g.	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 Hashimoto S, Takanari H, Compe E, Egly JM.	4. 巻 S0923-1811
2. 論文標題 Dysregulation of LXR responsive genes contribute to ichthyosis in Trichonhiodystrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 30042-30046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.01.012.	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 該当する

1. 著者名 高成広起、加治佐平	4. 巻 39
2. 論文標題 医光融合研究の最先端	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊オプトロニクス	6. 最初と最後の頁 111-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Yagishita F, Tanigawa J, Nii C, Tabata A, Nagamune H, Takanari H, Imda Y, Kawamura Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Fluorescent Imidazo[1,5-a]pyridinium Salt for a Potential Cancer Therapy Agent.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1110-1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00034.	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 Umeda R, Takanari H, Ogata K, Matsumoto S, Kitano T, Ono K, Tokumaru O.	4. 巻 64
2. 論文標題 Direct free radical scavenging effects of water-soluble HMG-CoA reductase inhibitors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 20-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-48.	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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Naya Y, Takanari H
2. 発表標題 Verification of mechanical load on ligament by mathematical model based on multiphoton microscope images.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木純子, 納谷友希, 金村洋平, 高成広起, 井上高教.
2. 発表標題 光分光法および画像解析を組み合わせた食品の非破壊分析.
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金村洋平, 高成広起.
2. 発表標題 皮膚ケラチノサイトの紫外線に対する光応答.
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 納谷友希, 高成広起.
2. 発表標題 数値シミュレーションモデルを用いた靱帯主要構成要素における力学的応答の検証.
3. 学会等名 第30回日本病態生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 納谷友希, 高成広起
2. 発表標題 血管強調画像における光源波長の効果
3. 学会等名 第98回日本生理学会、第126回日本解剖学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植田翠、高成広起、常山幸一
2. 発表標題 ラマン分光法による肺癌組織型の判別
3. 学会等名 第98回日本生理学会、第126回日本解剖学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 納谷友希、高成広起
2. 発表標題 Narrow Band Imaging (NBI)を用いた炎症部位の特定
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 納谷友希、高成広起、加治佐平
2. 発表標題 毛細血管の可視化を目指したNarrow Band Imaging (NBI)の光源特性検証
3. 学会等名 第81回日本応用物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanari H, Hayashi Y, Hase E, Minamikawa T, Yasui T, Ichimura-Shimizu M, Tsuneyama K.
2. 発表標題 Quantification of liver fibrosis by SHG microscopy.
3. 学会等名 Focus on Microscopy 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanari H, Hashimoto S.
2. 発表標題 The influence of KATP channel dysfunction on mitochondria.
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高成広起
2. 発表標題 細胞や組織のラベルフリー・イメージング：臨床応用を目指した研究
3. 学会等名 徳島大学医歯薬学研究部公開シンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高成広起
2. 発表標題 光で生体を見る：生理現象や病態の可視化を目指した研究
3. 学会等名 日本医科大学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanari H
2. 発表標題 The influence of KATP channel abnormality on calcium handling of endoplasmic reticulum.
3. 学会等名 The 9th. Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies/第96回日本生理学会大会 合同大会（国際学会）
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
研究 分担者	井上 高教 (INOUE Takanori) (40243969)	大分大学・理工学部・教授 (17501)	

	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 協力者	鈴木 絢子 (SUZUKI Ayako) (20780638)	大分大学・理工学部・助教 (17501)	

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
---------	---------