

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15195

研究課題名（和文）検出スペクトル情報の最適化によるラマン分光イメージングの高速化

研究課題名（英文）Targeting Raman spectral information and its application to faster Raman imaging

研究代表者

望月 健太郎（Mochizuki, Kentaro）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50868768

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生物試料分析に有用なラマン散乱顕微法における測定効率を改善するべく、分析対象に応じて検出対象とするラマンスペクトル情報を選定し、測定高速化への寄与を試みた。

肝脂肪化早期モデル試料を対象とした組織状態解析ではレチノールと脂質に帰属されるラマンバンドの強度変化から早期の脂肪化を検出できること、また複数種のヒト甲状腺細胞株を対象とした解析では還元型ヘムと脂質に帰属されるラマンバンドの強度対比から各細胞種を区別できる可能性が示された。

一部の成果につき国内外の学会および論文で発表を行い、また検出スペクトル情報を限定することで測定高速化を実現する多焦点ラマン散乱顕微鏡の構築も進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肝脂肪化早期モデルを対象とした組織状態解析とヒト甲状腺細胞株を対象とした細胞分析において有効なスペクトル情報を選別することにより、ラマン散乱顕微法による生物試料解析において測定を効率化できる可能性を示した点に学術的意義がある。

また、その達成はラマン散乱顕微法を活用した医学生物学的研究の促進に寄与するものと期待され、加えて、HE染色切片観察などの従来の病理学的診断手法では困難であった肝脂肪化の早期検出にラマン散乱顕微法が有用である可能性を示した点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In order to improve the efficiency in Raman microscopy, which is useful for the assessment of biological specimens, the necessary information depending on the analysis target was investigated, and the output was aimed to be applied for the fast Raman microscopic imaging.

In the analysis for fatty liver models, it was shown that the Raman bands attributed to retinol and lipid helped the detection of the liver steatosis in an early stage. And in the analysis of a human thyroid cell lines, the possibility that the intensity contrast between Raman bands of reduced heme and lipid enables the discrimination of those thyroid cell types.

A part of the results was presented at domestic and international conferences and on an academic journal. Also, a Raman microscopic system enabling faster imaging by limiting the Raman spectral information to be detected was under development.

研究分野：光学

キーワード：ラマン散乱顕微法の測定効率化 肝脂肪化の早期検出 細胞種の判別

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生物試料の構成分子や化学的環境を非染色で測定することのできるラマン散乱顕微鏡法は、生物学的分析や医学研究におけるスタンダードツールとしての定着が期待されてきたが、長い測定時間を要することがその課題の一つであった。光の散乱過程におけるラマン散乱の効率が低いことに起因するこの課題は、ラマン散乱顕微鏡の改良や測定手法の工夫によって徐々に改善がなされてきた。一例として、ライン走査型のラマン散乱顕微鏡[1,2]は、従来法(ポイント走査型)に比べ400倍以上の高速撮像を可能にし、細胞分裂時の細胞内小器官の動態や細胞死過程における細胞内物質の酸化還元動態などの無標識観察に用いられた[3]。しかしながら、細胞分析や医学研究で広く利用される染色ベースの測定技術と比較するとその測定速度は依然として数桁以上低く、ラマン散乱顕微鏡の実用化にはさらなる改善が求められる。

(2) ラマン散乱顕微鏡法で検出するスペクトル情報を測定目的に応じて最適化することで、その測定速度をさらに改善できると考えられる。細胞をはじめとする生物試料のラマンスペクトルを測定する際、一般的には装置で取得可能な最大限の波数域(500・3000  $\text{cm}^{-1}$  など)に渡るラマンスペクトルを検出する。しかしながら、多くの場合において測定目的を達成するために必要な波数域はその一部に限られると考えられ、例として主成分回帰分析を用いた細胞種判別について検証が行われた結果では100  $\text{cm}^{-1}$  程度の波数域のラマンスペクトルを対象にした場合でも90%以上の正確度で2種類のヒト乳腺由来細胞株の区別が可能であることが実証されている[4]。検出するラマンスペクトルの波数域を限定することが可能であれば、スペクトルの並列検出において一度に検出できるスペクトルの総数を増やすことが可能となり、ラマン散乱顕微鏡法の測定のさらなる高速化が実現すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、複数の測定目的を対象に必要なスペクトル情報を見極め、その測定に反映させることでラマン散乱顕微鏡の高速化を図ることを目的とする。測定事例として、脂肪肝モデル試料を対象とした早期脂肪化の検出、および複数種のヒト甲状腺細胞株を対象とした細胞種判別を対象とし、それぞれの目的を達成するために最低限必要なスペクトル情報を検討し、その結果につき組織細胞学的な評価とラマンイメージングの高速化への寄与を検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 既存のライン走査型ラマン散乱顕微鏡を用いて、肝脂肪化早期モデル試料と複数種のヒト甲状腺細胞株のラマンスペクトル測定を行い、そのラマンデータベースを用意する。肝脂肪化早期モデル試料として、脂肪食を1～14日間給餌したラットから摘出した肝臓をホルマリン固定した後、クライオトームで切り出した切片を測定に用いる。またヒト甲状腺細胞株は、濾胞上皮、濾胞癌、未分化癌、乳頭癌、髄葉癌由来の細胞株をそれぞれ基板上に播種して48時間培養した後に生きたまま測定を行う。得られたラマンデータベースを対象に、それぞれ早期脂肪化の検出と細胞種判別に要するラマンスペクトル情報を探索する。

(2) 既存のライン走査型ラマン散乱顕微鏡に照明光を多焦点化する光学系を組み込み、上記で選定されたラマンスペクトル情報のみを検出対象とすることで撮像の高速化が可能となる多焦点照明型ラマン散乱顕微鏡を構築する。

## 4. 研究成果

(1) 肝脂肪化早期モデルから得られたラマンスペクトルの解析では、給餌日数が増えるほど脂肪が蓄積する様子が、ラマンスペクトル上で脂質に帰属されるラマンバンド(2,854  $\text{cm}^{-1}$ )の強度の増加と、そのラマンバンドによって再構築されたラマン散乱像における脂肪面積の増加によって確認された。特に給餌日数1～3日における脂肪化超早期のモデルについては、従来の病理学的手法(HE染色切片像からの判別)では検出が困難であった微小脂肪滴もラマン散乱顕微鏡法により検出できることが実証された。また、レチノール(ビタミンA類)に帰属される1,588  $\text{cm}^{-1}$  のラマンバンドとその強度分布を参照することで、脂肪化超早期において検出された微小脂肪滴は肝臓に元来蓄えられていた含レチノール脂肪滴ではなく、脂肪食給餌により出現した脂肪滴であることもわかった(図1)。肝臓の主に星細胞に貯蔵されるレチノールは肝臓の線維化などに伴い消失することは知られているが[5]、本研究では脂肪化早期の過程でもその消失が起こり得ることが示された。結果として、肝脂肪化早期モデルを対象としたラマン散乱顕微鏡法では、脂質に帰属される2,854  $\text{cm}^{-1}$  を含む波数域から脂肪食給餌による脂肪の段階的な蓄積を鋭敏に捉えられ、加えて、レチノールに帰属される1,588  $\text{cm}^{-1}$  を含む波数域も同時に参照することで肝脂肪化超早期における脂肪滴の蓄積をより正確に判断できることが示された。本研究成果の一部を、国内外の学会および論文[6]での発表を行なった。

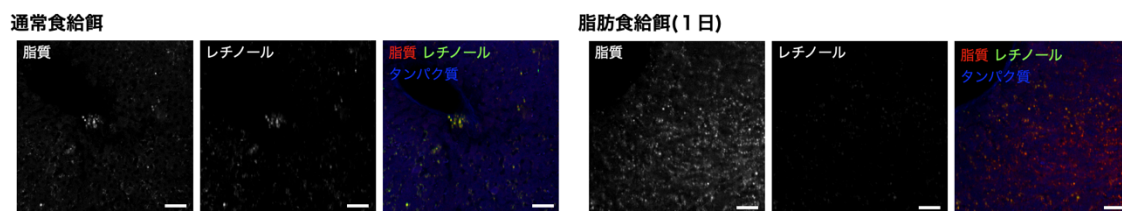


図1 通常食給餌したラットおよび脂肪食を1日給餌したラットから抽出した肝臓のホルマリン固定切片のラマン散乱像。脂質およびレチノールの分布はそれぞれ  $2854\text{cm}^{-1}$ 、 $1588\text{cm}^{-1}$  のラマンバンド強度を基に再構築された(合成像には細胞の分布を示すために  $1680\text{cm}^{-1}$  のラマンバンド強度に基づくタンパク質の分布も使用)。通常食給餌モデルでは脂肪滴とレチノールの分布が一致しているのに対し、脂肪食給餌モデルでは給餌日数1日のみで脂肪滴の蓄積とレチノールの消失が見られる。励起波長  $532\text{nm}$ 、露光時間  $5\text{s}/\text{spectrum}$ 。スケールバーは  $50\mu\text{m}$ 。

(2) ヒト甲状腺細胞株から取得したラマンスペクトルの解析では、主成分分析により各種細胞株のスペクトル情報の特徴抽出を行なった結果、細胞質領域における還元型ヘム(主にシトクロム c)に帰属されるラマンバンド( $749\text{cm}^{-1}$ )と脂質に帰属されるラマンバンド( $2,854\text{cm}^{-1}$ )の強度対比を主成分とする尺度によって甲状腺濾胞上皮細胞株と甲状腺癌細胞株(濾胞癌、未分化癌、髄様癌、乳頭癌)の各ラマンスペクトル群(各細胞株につき $>4,000$  スペクトル)を分離できることが示された。還元型ヘムのラマンバンドのみあるいは脂質のラマンバンドのみを主成分とする尺度や、細胞核領域から得られたラマンスペクトル群の主成分では同程度以上の分離が得られなかった点から、両ラマンバンドの情報を合わせて参照することが有効であると判断した。本研究成果については、現在論文の投稿準備を進めている。

(3) 多焦点照明型ラマン散乱顕微鏡の構築では、既存のライン走査型ラマン散乱顕微鏡の光学系にデジタルマイクロミラーデバイス(DMD)を組み込むことにより照明光の多焦点化を行なった。主に DMD における入射光の回折により励起光強度が想定以上に損失することがわかり、引き続き光学系の再配置などによる改善を進めている。DMD をはじめとする照明光の多焦点化に使用する光学素子の購入に際しては、昨今の半導体材料不足や為替相場の変化の影響により製品の入手が大幅に遅れ、多焦点照明型ラマン散乱顕微鏡の構築に遅れが生じた。

#### <引用文献>

- [1]K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith, M. Kobayashi, Y. Inouye, S. Kawata, "Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells", *J. Biomed. Opt.*, **13**, 044027 (2008)
- [2]A. F. Palonpon, J. Ando, H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Sodeoka, S. Kawata, K. Fujita, "Raman and SERS microscopy for molecular imaging of living cells", *Nat. Protoc.*, **8**, 677-692 (2013)
- [3]J. Ando, A. F. Palonpon, M. Sodeoka, K. Fujita, "High-speed Raman imaging of cellular processes", *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **33**, 16-24 (2016)
- [4]Y. Kumamoto, K. Mochizuki, K. Hashimoto, Y. Harada, H. Tanaka, K. Fujita, "High-Throughput Cell Imaging and Classification by Narrowband and Low-Spectral-Resolution Raman Microscopy", *J. Phys. Chem. B*, **123**, 2654-2661 (2019)
- [5]H. Senoo, K. Yoshikawa, M. Morii, M. Miura, K. Imai, Y. Mezaki, "Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative - past, present and future", *Cell Biol. Int.*, **34**, 1247-1272 (2010)
- [6]M. Takemura, K. Mochizuki, Y. Harada, A. Okajima, M. Hayakawa, P. Dai, Y. Itoh, H. Tanaka, "Label-free Assessment of the Nascent State of Rat Non-alcoholic Fatty Liver Disease Using Spontaneous Raman Microscopy", *Acta Histochem. Cytochem.*, **55**, 57-66 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masashi Takemura, Kentaro Mochizuki, Yoshinori Harada, Akira Okajima, Michiyo Hayakawa, Ping Dai, Yoshito Itoh, Hideo Tanaka	4. 巻 55
2. 論文標題 Label-free Assessment of the Nascent State of Rat Non-alcoholic Fatty Liver Disease Using Spontaneous Raman Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 57～66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.22-00013	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 望月健太郎、竹村雅至、原田義規、田中秀央
2. 発表標題 自発ラマン散乱顕微法を利用した脂肪化早期における脂肪滴形成およびレチノール喪失の定量評価
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kentaro Mochizuki, Masashi Takemura, Yoshinori Harada, Hideo Tanaka
2. 発表標題 Assessment of lipid droplet formation and retinol depletion in nascent state of liver steatosis by Raman microscopy
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月健太郎、竹村雅至、早川路代、田村昌子、原田義規、田中秀央
2. 発表標題 肝脂肪化早期における脂肪沈着とレチノール消失の無標識検出および定量評価
3. 学会等名 第69回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2022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
---------	---------