

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25288010

研究課題名(和文) ラマン分光による生細胞の絶対定量的分子イメージングと物理化学の生命科学への展開

研究課題名(英文) Absolutely quantitative molecular imaging of living cells by Raman spectroscopy and development of physical chemistry toward life sciences

研究代表者

浜口 宏夫 (Hamaguchi, Hiro-o)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・教授

研究者番号：00092297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン分光による生細胞の絶対定量的分子イメージングのための基礎研究として、基本的分子の絶対ラマン散乱断面積の決定を試みた。量子化学計算により、水素分子の分極率テンソルを計算した。計算値は既報の分極率の異方性およびその結合距離に関する一次および二次の微係数を良く再現した。この理論値を用いて、水素分子の回転ラマン絶対散乱断面積を計算し、ラマン散乱強度決定のための一次標準とした。水素ガスおよび気体ベンゼンのラマン散乱強度を同一条件下で測定し、気体ベンゼンの絶対ラマン散乱断面積を決定した。得られた気体ベンゼンの絶対ラマン散乱断面積を誘電場補正により液体の値の換算すると、文献値と誤差範囲内で一致した。

研究成果の概要(英文)：We attempted to determine the absolute Raman cross sections of fundamental molecules in order to achieve absolutely quantitative molecular imaging of living cells. We first quantum-chemically calculated the Raman scattering tensor of the hydrogen molecule. The calculated tensor well reproduced the experimentally determined polarizability anisotropy and its first- and second derivatives with respect to the bond length. We use this theoretical Raman scattering tensor to calculate the absolute Raman cross sections of the pure rotational Raman transitions to be used as the primary standard of the Raman intensity measurement. We measured Raman intensities of gaseous hydrogen and benzene vapor under the same experimental conditions and determined the absolute Raman cross section of benzene vapor. The obtained absolute Raman cross section agreed well with the literature values after the correction for the dielectric field effect.

研究分野：物理化学

キーワード：ラマン分光 分子イメージング 絶対散乱断面積 生細胞

1. 研究開始当初の背景

ラマンスペクトルは「分子の指紋」と呼ばれるように、詳細な分子構造情報を含んでいる。ラマンスペクトルに基づくラマン分光はしたがって、高い分子特異性を有する。この分子特異性に加えて、ラマン分光は、高い空間および時間分解特性をも有しており、見ている分子がいつ、どこで、どのような振る舞いをするかを実時間で詳細に調べることができる。研究代表者は、平成 15 年度学術創成研究「時空間における分子振動計測の極限化：分子から細胞まで物質組織化機構の解明に向けて」により、ラマンスペクトルのバンド毎にイメージを作成するラマン分光イメージングが、生細胞の分子レベル時空間解析に極めて有効であることを示した。例えば、単一酵母生細胞が分裂する過程をラマン分光によって追跡し、細胞分裂にともなって細胞内の分子組成や空間分布が劇的に変化する様子を、非破壊かつ非染色、あるがままに観測することに初めて成功した。

しかし、ラマンスペクトルの各バンドの相対強度を 2 次元プロットしたラマンイメージは、あくまで生体分子の相対的な存在量を示したものに過ぎない。もしある分子の絶対濃度の空間分布とその時間変化を時々刻々追跡することができれば、生細胞の機能を分子レベルで、物理化学的定量性に基いて解析する道が新たに開ける。これはまさにシュレディンガーが著書「What is life?」で提起した「How can the events in space and time which take place within the spatial boundary of a living organism be accounted for by physics and chemistry?」という問いに答えるものである。しかし、生細胞内分子の絶対濃度を時空間分解計測する物理化学的手法は、現在のところ存在しない。

2. 研究の目的

生きた細胞内のどこに、いつ、どの分子が、どれだけ存在し、何をしているかを、非破壊かつ非染色、あるがままに調べることができる「絶対定量的ラマン分光イメージング」の手法の確立を目標とする。蛍光イメージングなど、従来の分子イメージング手法が成し得なかった生細胞内分子濃度の絶対定量化を実現し、生命科学に物理化学的定量性という新しい基軸を導入する。これまで長年にわたって蓄積されて来た生体分子のラマンスペクトル情報、およびその解析ノウハウに基づいて、生細胞内分子の構造、ダイナミクス、環境と生物学的機能の関連を定量的に議論する学術基盤を構築し、「生細胞物理化学」とも呼ぶべき化学の新分野の開拓を目指す。

3. 研究の方法

単一生細胞の絶対定量的ラマン分光イメージングの手法を確立するためには、生細胞中に存在する脂質、蛋白質、核酸などの基本的生体分子の絶対ラマン散乱断面積を知る必要がある。その目的のために、まず気体分子のラマン散乱強度を高い精度で測定することが可能なラマン分光計を整備する。同時に、水素分子 (H_2) のラマン散乱強度を、量子化学計算により高い精度で求め、これをラマン散乱強度の一次標準とする。同一の照射、集光光学系で H_2 分子とベンゼン分子 (気体) 測定し、ベンゼン分子の絶対ラマン散乱断面積を決定する。次に、得られたベンゼン気体の絶対散乱断面積を誘電場補正によってベンゼン液体の値へ換算し、既報の文献値と比較する。続いて、液体ベンゼンを標準として、多数の基本的有機分子、無機分子、生体分子の絶対ラマン散乱断面積を決定する。以上のラマン散乱強度の定量的研究では、異なるラマンシフト (したがって異なる波長で観測される) での強度を比較しなければならない。したがって、用いるラマン分光計の感度を精度よく校正しておくことが不可欠である。本研究では、理論的に求めた水素分子の分極率から、 H_2 、 D_2 、 HD 分子の回転ラマン散乱強度を計算し、その相対強度を標準としてラマン分光計を校正する。低波数の領域では、酸素分子 O_2 の回転ラマンスペクトルも併用する。

4. 研究成果

4. 1 ラマン分光計の整備

整備したラマン分光計の概略を図 1 に示す。励起光源として、Nd:YAG レーザーの 2 倍波 (cw 発振、波長 532 nm、試料点での出力約 200 mW) を用いた。試料へのレーザー照射およびラマン散乱光の集光には、顕微鏡用対物レンズ (倍率 20X、NA=0.25) を用いた。ラマン散乱光は、3 枚のノッチフィルターでレイリー散乱と分離した後、分光器により波長分解し、CCD 検出器によって検出した。波数分解能は約 10 cm^{-1} であった。

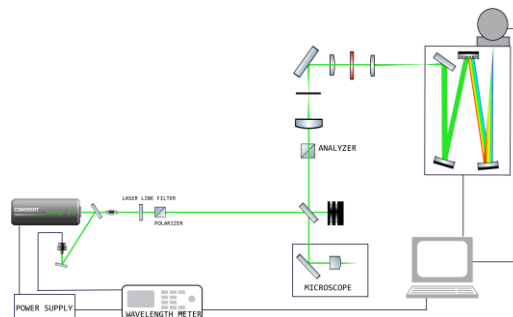


図 1. 整備したラマン分光計

4. 2 水素分子の分極率の量子化学計算
水素分子 (H₂) の分極率テンソルを、Coupled cluster singles doubles model により DALTON 2015 を用いて計算した。D₂ および HD の分極率テンソルは H₂ のものと同一であると仮定した。計算された分極率テンソルの異方性 γ を実験値と比較したところ、表 1 に示すように良い一致を示した。したがって、計算によって求めた水素分子の分極率テンソルは、ラマン散乱強度の標準として用いるのに十分な精度を有していると結論した。

表 1. 水素分子の分極率異方性 (γ_0) およびその結合距離に関する 1 次および 2 次微係数 (γ_1 および γ_2) の計算値と実験値の比較

	計算値	実験値
γ_0	3.11×10^{-25} cm ³	$3.14 \pm 0.03 \times 10^{-25}$ cm ³ [1]
γ_1 / γ_0	2.660	2.53 ± 0.13 [2]
γ_2 / γ_0	4.374	3.97 ± 1.33 [2]

次に H₂、D₂ および HD 分子の振動回転固有関数を、ハミルトニアン の直接対角化によって計算した。計算された固有関数は、H₂、D₂ および HD 分子の解離エネルギーおよび振動回転遷移エネルギーを 0.01% 以下の誤差で再現した。したがって、これらの固有関数は振動回転ラマン散乱強度を計算するのに十分な精度を有していると結論した。

上記分極率異方性と振動回転固有関数を用いて、振動基底状態における回転行列要素を計算し、H₂、D₂ および HD 分子の回転ラマン散乱強度を求めた。

4. 3 ラマン分光計の感度較正

ラマン分光計の較正に用いた H₂、D₂、HD、O₂ 分子の回転ラマンスペクトルを図 2 に示す。H₂ の 6 本、D₂ の 8 本、HD の 8 本、O₂ の 13 本、計 35 本のバンドを用いるとラマンシフト -400cm⁻¹ から 1000cm⁻¹ の領域をカバーすることができる。

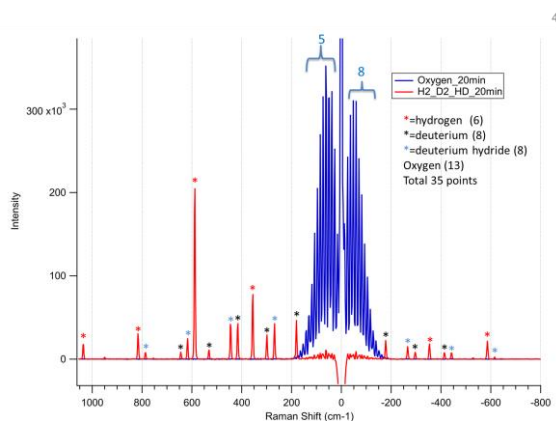


図 2. 感度較正に用いた H₂、D₂、HD、O₂

これらの回転スペクトルの相対強度の理論値 (H₂、D₂、HD では量子化学計算による理論値、O₂ では分極率近似に基づく理論値) と、実際に観測される強度を比較することによって、図 3 の感度曲線を得た。感度曲線は、一次曲線 $y=ax+b$ ($a=0.825 \pm 0.001$ 、 $b=-0.000193 \pm 0.000002$) でよく表された。

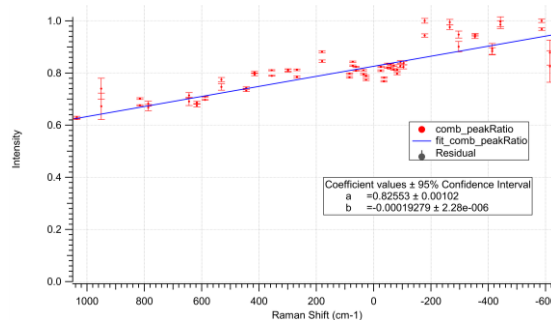


図 3. H₂、D₂、HD、O₂ 分子の回転ラマン

4. 4 絶対ラマン散乱断面積の決定

H₂ ガスと気体ベンゼンのラマンスペクトルを同一条件下で測定し、気体ベンゼン 992cm⁻¹ バンド (呼吸振動) の平行成分の絶対微分散乱断面積を求めた。つぎに、誘電場の補正

$$L(\lambda) = \left(\frac{n(\lambda_i)^2 + 2}{3} \right) \left(\frac{n(\lambda_s)^2 + 2}{3} \right)^3$$

を行って、液体ベンゼンの絶対微分散乱断面積を算出した。結果を表 2 に示す。

表 2. 液体ベンゼン 992cm⁻¹ バンドの平行成分の絶対微分散乱断面積 (単位 cm²/sr)

本研究	文献 [3]-[6]
$2.43 (\pm 0.12) \times 10^{-29}$	$2.66 (\pm 0.18) \times 10^{-29}$ [3]
	$2.48 (\pm 0.12) \times 10^{-29}$ [4]
	$2.62 (\pm 0.12) \times 10^{-29}$ [5]
	$2.23 (\pm 0.10) \times 10^{-29}$ [6]

水素分子のラマン散乱強度の理論値を強度標準とする本研究の結果と、実験的に求めた文献値とが良い一致を示すことは、ベンゼンの絶対ラマン散乱断面積が高い確度で決定されていることを意味する。本研究の成果は、今後の絶対定量的ラマン分光イメージング手法の確立に向けた確実な第一歩である。

<引用文献>

- ① N. J. Bridge, A. D. Buckingham, The polarization of laser light scattered by gases, Proc. Royal Soc. A, 295 巻、1966、334-349
- ② H. Hamaguchi, A. D. Buckingham, W. J. Jones, Determination of derivatives of the polarizability anisotropy II. Hydrogen and nitrogen molecules, Mol. Phys., 43 巻、1981、1311-1319
- ③ K. T. Schomacker, J. K. Delaney, P. M. Champion, Measurements of the Absolute Raman Cross-Sections of Benzene, J Chem Phys, 85 巻、1986、4240-4247
- ④ N. Abe, M. Wakayama, M. Ito, Absolute Raman intensities of liquids, Journal of Raman spectroscopy, 6 巻、1977、38-41
- ⑤ Y. Udagawa, N. Mikami, K. Kaya, M. Ito, Absolute Intensity Ratios of Raman Lines of Benzene and Ethylene Derivatives with 5145A and 3371A Excitation, J Raman Spectroscopy, 1 巻、1973、341-346
- ⑥ Y. Kato, H. Takuma, Absolute Measurement of Raman-Scattering Cross Sections of Liquids, JOSA, 61 巻、1971、347-350

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Po-Hsiung Chen, Rintaro Shimada, Soshi Yabumoto, Hajime Okajima, Masahiro Ando, Chiou-Tsu Chang, Li-Tzu Lee, Yong-Kie Wong, Arthur Chiou, Hiro-o Hamaguchi, Automatic and objective oral cancer diagnosis by Raman spectroscopic detection of keratin with multivariate curve resolution analysis, Scientific Reports, 査読有、6 巻、2016、411-417
DOI: 10.1038/srep20097
- ② Michiyo Motoyama, Masahiro Ando, Keisuke Sakai, Ikuyo Nakajima, Koichi Chikuni, Katsuhiko Aikawa, Hiro-o Hamaguchi, Simultaneous imaging of fat crystallinity and crystal polymorphic types by Raman microspectroscopy, Food Chemistry, 査読有、196 巻、2015、411-417
DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.043
- ③ Masahito Hosokawa, Masahiro Ando, Shoichiro Mukai, Kyoko Osada, Tomoko Yoshino, Hiro-o Hamaguchi, Tsuyoshi Tanaka, In Vivo Live Cell Imaging for the Quantitative Monitoring of Lipids by Using Raman Microspectroscopy, Analytical Chemistry, 査読有、86 巻、8224-8230
DOI: 10.1021/ac501591d
- ④ Rimi Miyaoka, Masahito Hosokawa, Masahiro Ando, Tetsushi Mori, Hiro-o

Hamaguchi, Haruko Takeyama, In Situ Detection of Antibiotic Amphotericin B Produced in Streptomyces nodosus Using Raman Microspectroscopy, Marine Drugs, 査読有、12 巻、2014、2827-2839
DOI: 10.3390/md12052827

- ⑤ Masanari Okuno, Hideaki Kano, Kenkichi Fujii, Kotatsu Bito, Satoru Naito, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Hiro-o Hamaguchi, Surfactant Uptake Dynamics in Mammalian Cells Elucidated with Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy, Plos One, 査読有、9 巻、e93401
DOI: 10.1371/journal.pone.0093401
- ⑥ Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, Molecular component distribution imaging of living cells by multivariate curve resolution analysis of space-resolved Raman spectra, J. Biomedical Optics, 査読有、19 巻、2014、011016
DOI: 10.1117/1.JBO.19.1.011016
- ⑦ Minoru Kakita, Masanari Okuno, Hiro-o Hamaguchi, Quantitative analysis of the redox states of cytochromes in a living L929 (NCTC) cell by resonance Raman microspectroscopy, Journal of Biophotonics, 査読有、6 巻、2013、256-259
DOI: 10.1002/jbio.201200042

[学会発表] (計 7 件)

- ① Hiro-o Hamaguchi, Raman big data analysis for automatic and objective living cell discrimination/diagnosis, Pittcon Conference and EXPO 2016, invited talk, Atlanta, 2016.3
- ② Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, Reading molecular fingerprint more wisely, Pacificchem 2015, invited talk, Honolulu, 2015.12
- ③ Masahiro Ando and Hiro-o Hamaguchi, Automatic and Objective Cell Discrimination by Raman Spectroscopy with Multivariate Curve Resolution, The 5th Asian Spectroscopy Conference, invited talk, Sydney, 2015.10
- ④ Hiro-o Hamaguchi, Fast, Automatic and Label-free Cell Discrimination by Raman Microspectroscopy, Optics and Photonics Taiwan International Conference 2014, invited talk, Taichung, 2014.12
- ⑤ Hiro-o Hamaguchi, Molecular Fingerprinting and mapping of living cells by Raman microspectroscopy, Advances in Live Single-cell Thermal Imaging and Manipulation, Okinawa Institute of Science and Technology Symposium, invited talk, Okinawa, 2014.11
- ⑥ Hiro-o Hamaguchi, Recent Advances in

Raman Spectral Imaging of Living Cells:
Development at Tokyo and Hsinchu、The 4th
Asian Spectroscopy Conference、invited talk、
Singapore、2013.12

- ⑦ Hiro-o Hamaguchi、Diversity and Future of
Raman Spectroscopy: What Can We Look at
by Spontaneous Raman and Other Analogues
of Raman Scattering? 、The 7th International
Conference on Advanced Vibrational
Spectroscopy、Opening plenary lecture、
Kobe、3013. 8

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 浜口宏夫、岩田耕一共編著、講談社サイ
エンティフィク、ラマン分光法、2015、
205

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜口宏夫 (HAMAGUCHI, Hiro-o)
早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・
客員上級研究員 (研究院客員教授)
研究者番号 : 00092297

(2) 研究分担者

石橋孝章 (ISHIBASHI, Taka-aki)
筑波大学・数理物質科学研究科・教授
研究者番号 : 70232337