

ラマン分光が拓く新バイオイメージング

物理学系専攻 応用物理学コース
教授 藤田 克昌

1. はじめに

生物学、医学研究において、顕微光学イメージングは必須の技術となっている。細胞や生体組織を生きたまま顕微観察し、その内部での分子の振る舞いを可視化する。蛍光染色などの技術も進歩し、様々な生命現象が可視化され、その理解に役立つ情報を光学顕微鏡は提供してきた。しかし光学顕微鏡の魅力はイメージングだけではない。いわゆる分光分析法は、光の色、すなわち光の波長がもつ情報を用いて、試料中の物質の同定や材料分析を可能とする。最近、この分光分析技術とイメージング技術とを高度に融合された分光イメージング技術の開発が進んでいる。

本稿では、最近我々の研究室で取り組んでいる、ラマン分光技術とイメージング技術とを融合させたバイオイメージング技術について紹介する。ラマン分光法は、分析対象に光を照射し、そこから生じる散乱光のスペクトルから、試料に含まれる分子の構造や結晶格子の情報を取得する。これと顕微鏡光学技術を組み合わせることで、細胞などの微細な空間の物質を同定しながら、その分布を観察することが可能となる。従来のバイオイメージングにおいては、観察対象を色素で染色することにより、生体内の分子情報を可視化してきた。ラマン分光イメージングでは、試料内の分子振動を検出することで生体分子の情報を得て、その分布を可視化する。従来の染色法ほどの特異性はないが、ラマン分光法は、タンパク質、脂質、核酸などの分子をおおまかに分類し、細胞や生体組織を分析できるため、ラマン散乱を用いた無標識での細胞状態や細胞種の判別、病理診断に関する応用研究が進んでいる。

2. ラマン分光イメージング

ラマン散乱は、1928年にラマンらにより報告され、その2年後にはラマンはこの発見に関してノーベル賞を受賞した。以降、ラマン分光法は、レーザーの発明や高感度な光検出器の登場などの光技術の発展と共に、様々な物質分析技術として発展している。特に近年では、顕微イメージング技術との融合により、従来から利用されてきた材料分析に加えて、バイオメディカル分野への応用に向けた研究が進んでいる。

ラマン散乱は微弱な光学効果であるため、微小な領域からの光を計測する顕微イメージングに利用する場合、長い撮像時間が必要となることが課題であった。特に、生体試料の場合は、散乱光が弱く、また撮像時間も限られるため、ラマン分光イメージングの利用はあまり進んでいなかった。しかし、近年の光学技術の発展により、微弱な散乱光を効率良く取得できる手法が登場し、生体試料の撮像に必要な時間が大きく短縮された。

我々の研究室では、ラマン分光イメージングを高速化する技術の開発と、そのバイオメディカル応用についての研究を行っている。高速化の手法としては、試料の複数箇所を並列に計測する技術を開発している[1-3]。従来のラマン分光イメージングでは、スポット状

の光で試料を照明し、一点ずつスペクトル計測を繰り返す必要があった。我々は、ライン状の光で試料を照明することにより、試料上の数百から数万点のラマン散乱スペクトルを同時に取得する技術を開発した。これらの技術開発により、従来技術に比べて、数百から数千倍の速度でラマン分光画像を取得することが可能となった。

3. 生細胞の無標識観察

図1に、我々の開発したラマン散乱顕微鏡による細胞観察の例を紹介する。図1aはヒト子宮頸癌細胞（HeLa細胞）に含まれる、脂質分子、タンパク質、およびシトクロームを観察した例である。ラマン散乱スペクトルにより、細胞内の物質情報を取得し、その分布を画像化した結果、細胞内で脂質分子が脂肪滴を形成している様子や、タンパク質が細胞全体に分布している様子が確認された。また、タンパク質の一種であるシトクロームが高効率に検出できることを見だし、この結果ではその信号のミトコンドリアへの局在を確認した。ここでは、ミトコンドリアに局在するc型のヘム（鉄-ポルフィリン錯体）を含むシトクローム（シトクロームc）が顕著に現れており、これを利用して、薬剤投与におけるミトコンドリア活性の変化を無染色かつ高感度に検出できることを発表している[4, 5]。

図1bはヒト肝細胞による薬剤代謝の様子を観察した例である。肝臓の細胞は様々な物質の代謝のためシトクロームP450（CYP）という酵素を利用することが

知られている。この酵素をラマン散乱顕微鏡により無標識に観察できることを見いだした[6]。図1bの結果では、リファンピシン（RIF）という薬剤を細胞に投与し、その際に誘導されるCYPと、細胞内のシトクロームcとを画像化している。薬剤の投与に応じてCYPの量が増加し、酵素活性が上昇している様子が観察されている。

上記の他にも、幹細胞の分化や免疫細胞の活性化によるラマン散乱スペクトルの変化なども確認されており、細胞内の分子を分光分析することにより、色素による処理無しで細胞の分化状態や細胞種を区別できることが示されてきた[7]。また、癌化した細胞をラマン分光スペクトルで区別できることは多くの研究例が示されており、無侵襲な診断技術に活用できる技術として期待されている。

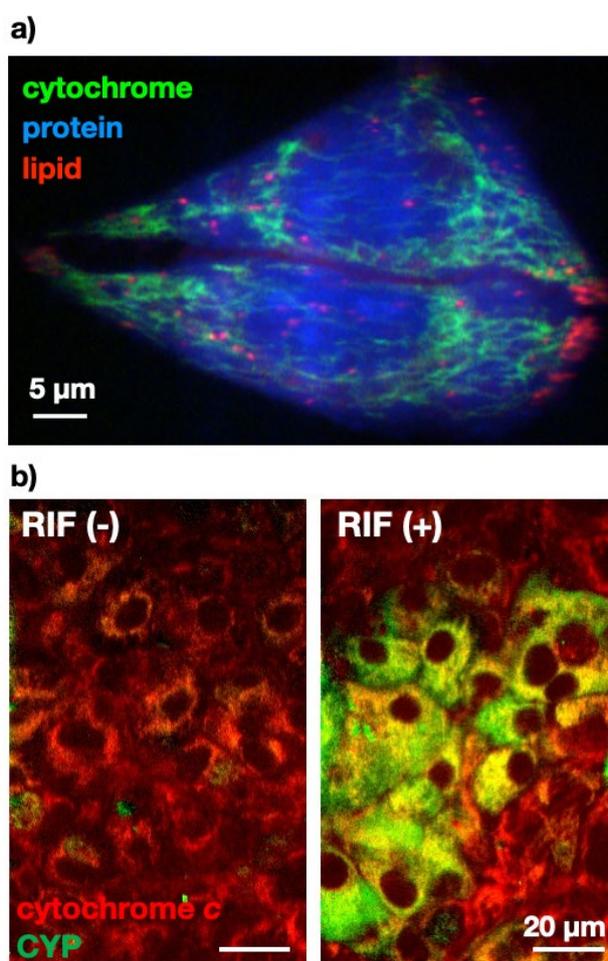


図1 a)ヒト癌細胞の無標識、および
b)ヒト肝細胞の無標識ラマン散乱像

4. 細胞や生体組織の品質評価に向けて

上述したようにラマン分光法により、無標識に細胞の状態や種別を見分けることが可能となるため、細胞や生体組織の品質評価にラマン散乱を活用するための研究開発を進めている。近年、スフェロイドやオルガノイドといった、直径数百マイクロメートル程度のミニ生体組織/臓器を、創薬やテーラーメイド医療、再生医療に活用する試みが進んでいる。これらのミニ組織/臓器を色素により染色するには手間がかかるため、無染色に組織内部を観察できるラマン散乱顕微鏡の利用が期待されている。

図2は、ラマン散乱により観察した癌細胞スフェロイドである。試料を側方から照明するという特殊な照明技術を開発し、試料内部の余計な光散乱を抑制することにより、試料内の細胞分布を無標識に可視化することに成功した[8]。現在、各種用途に利用するスフェロイド/オルガノイドの非破壊での品質評価へ本技術を利用することを旨とし、応用研究を進めている。

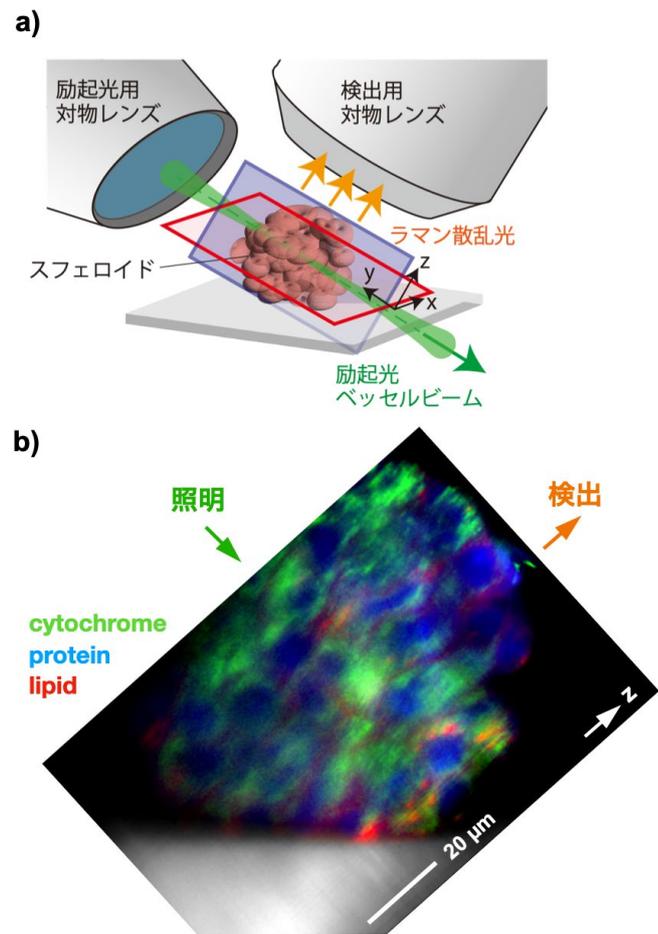


図2 a)側方照明ラマン顕微鏡
b)ヒト癌細胞スフェロイドのラマン散乱像

5. おわりに

計測や観察は、主に、その存在が分かっているものの確認に行われることが多い。物体の長さや重さは、それが存在すること分かっているから測定する。バイオイメージングでは、標識された試料の観察が主流であることから分かるとおり、対象の存在を確認するために実施されることが多い。しかし、ここで紹介した分析とイメージングの融合技術は、対象を特定せずに観察し、その結果の中に新しい発見を求めることを可能とする。このような新しい観察技術は、これまで見えなかったものを可視化し、我々の純粋な興味を引き出す。それを理解したいという熱意が新しい科学を創り、これまでの学理の枠を超えた学問を発展させる。科学をより自由にする技術を開発していきたいと思う。

6. 参考文献

- [1] K. Hamada, K. Fujita, N. I. Smith, M. Kobayashi, Y. Inouye, S. Kawata, *J. Biomed. Opt.*, **2008**, 13, 044027.
- [2] AF. Palonpon, J. Ando, H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Sodeoka, S. Kawata, K. Fujita, *Nat. Protoc.*, **2012**, 8, 677–692.

-
- [3] K. Mochizuki, Y. Kumamoto, S. Maeda, M. Tanuma, A. Kasai, M. Takemura, Y. Harada, H. Hashimoto, H. Tanaka, N. I. Smith, K. Fujita, *Biomed. Opt. Express.*, **2023**, 14, 1015–1026.
- [4] M. Okada, N. I. Smith, A. F. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka, K. Fujita, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 28–32.
- [5] M. Li, H.-X. Liao, K. Bando, Y. Nawa, S. Fujita, K. Fujita, *Anal. Chem.*, **2022**, 94, 10019–10026.
- [6] M. Li, Y. Nawa, S. Ishida, Y. Kanda, S. Fujita, K. Fujita, *Commun. Biol.*, **2022**, 5, 778.
- [7] T. Ichimura, L.-d. Chiu, K. Fujita, H. Machiyama, S. Kawata, T. M. Watanabe, H. Fujita, *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 11358.
- [8] K. Bando, S. Yabuuchi, M. Li, T. Kubo, R. Oketani, N. I. Smith, K. Fujita, *Biomed. Opt. Express.*, **2022**, 3, 3161–3170.

(応物 1995 年卒 1997 年前期 2000 年後期)