

## 顕微ラマン分光法がバイオメディカル研究に与えたインパクト

Impact of Raman Microscopy on Biomedical Research

Fran ADAR

Catalina DAVID

Marinella SANDROS

ラマン分光法は、赤外(IR)吸収分光法を補完する振動分析手法である。この2つの手法は分子や結晶の振動を通じて材料の情報を提供する。赤外分光法がより広汎に利用される一方、ラマン分光法は明確に異なる特徴を持っており、これが生体物質の測定にメリットをもたらす。本稿で紹介する3つのトピック(微生物同定・疾患診断・ラマンイメージング)は、顕微ラマン分光法が世界的に画期的な活躍を遂げている事例や、導入によって未解決の問題を克服する可能性を取り上げている。これらの活動の一部にとって極めて重要な意味を持つ測定装置のイノベーション(とりわけラボオンチップ)に関する情報についても触れる。参照先はすべてが網羅されているわけではないが、関心を抱いた読者に諸文献への入口を示すものとなれば幸いである。

Raman spectroscopy is a vibrational technique complimentary to Infrared (IR) Absorption. They both provide information on materials via their molecular and crystalline vibrations. While IR spectroscopy has been used more widely, Raman has some distinctly different characteristics that provide advantages when making measurements on biological materials. For this article we have selected three topics where there is groundbreaking activity in Raman microscopy worldwide and where the implementation has potential to solve outstanding problems. Information on instrumentation innovations that are critical to some of this work (especially lab-on-a-chip) will be mentioned. The references, while not exhaustive, will provide the interested reader entry to the literature. The topics that have been selected are identification of bacterial micro-organisms, disease diagnosis, and Raman imaging.

### はじめに

ラマン分光法は新しい手法ではなく、1928年にC. V. Ramanによって最初に紹介された。ラマン分光法は当初、少数の先進的物理学の研究所の領分で用いられていたが、その後は有用で多用途な非侵襲的分析手段へと進化し、迅速な化学物質の検出や識別を可能にした。この手法は単色のレーザー光と試料における化学結合との相互作用を測定するもので、試料の分子や構造の構成についての豊富なスペクトル情報が取得できる。光の照射を利用する手法であるため、光学顕微鏡下で測定できるようにすることも可能だ。

ラマン分光法および顕微ラマン分光法は、その振動スペクトルに含まれる情報の豊富さから、バイオメディカル研究において長い間関心事となっていた。タンパク質、脂質、

核酸、および炭水化物のスペクトルにはそれぞれ特徴的な差異を見出すことができるが、細菌等では特定の分類に属する種を同じ分類の別の種と区別することも可能である。興味を持った研究者がラマン分光法の入門書を手に入れることのできる場は数多く存在するが、バイオメディカル分野に関しては、各種の生体材料に割り当てられるラマン振動周波数を網羅した表が掲載されたレビュー論文<sup>[1]</sup>をお勧めする。

バイオメディカル研究におけるラマン分光法／顕微法の利用は、ここ20年に至るまでは技術的ハードルによって妨げられていた。数々のイノベーションによって状況は変化を遂げており、同技術の応用は急激に進んでいる。本稿では、顕微ラマン分光法がバイオメディカル分野に画期的変革をもたらす可能性のある、極めて活動的ないくつかの領域を探る。

## 微生物同定

細菌の通常の大きさは、0.5~1.0 μm前後のレーザー光の集光サイズにほぼ相当する。つまり、集光したレーザー光により生成されたスペクトルはすべて、その細菌性生物の全体を表している可能性が高いということである。1990年には早くも単一細胞のスペクトルが報告され<sup>[2]</sup>、その後単一細菌細胞のスペクトルも2000年<sup>[3]</sup>と2004年<sup>[4]</sup>に発表された。Schusterらによる2000年の発表では、貯蔵された顆粒や成長段階に関連した化学組成の変化を容易に特定できることが示された。暫定的にバンドを帰属し、7つの異なる細菌種をスペクトルによって識別したのが2004年の研究である。またHuangらは、任意の生物の成長段階(表現型分類)を判別できること、<sup>13</sup>Cを多く含むグルコース炭素源で培養された試料では、細菌内で新たに合成される分子に重量の大きいこの同位体が含まれることを反映して、一部のラマンバンドが明瞭なレッドシフトを起こすことを示した。この同位体シフトの検出能力によって、非常に重要なアプリケーションである細菌代謝の追跡が可能となることは明らかであろう。

例えば2007年、Huang教授のグループは、安定同位体プロービング(SIP)ラマン分光法と蛍光in situハイブリデーション(FISH)を組み合わせ、同位体標識を施したナフタレンの環境中での分解を追跡した<sup>[5]</sup>。この研究ではナフタレンの分解が特定できること、および<sup>13</sup>Cを細菌に取り込ませ、どの細菌が分解に関与しているか識別できることの2つが重要であった。また、同研究は実験室標本ではなく地下水の中にて行われた。培地では培養不可能な細菌を得るためである。実験室では培養できない生命体の割合が大きいことから、これは極めて重要なことであった。

同グループからさらに1歩進んだのが「ラマン分光法を用いた細胞分離」(RACE)<sup>[6,7]</sup>である。このスキームでは、細胞がマイクロ流体素子を通して流れる間に単一細胞のラマンスペクトルを記録し、当該細胞を収集して生物学的検定に使用するか判断を行うことができる。その狙いは「遺伝子発現を、細胞の生理学的状態や表現型に関連付ける」ことである。

微生物の同定は臨床的にも環境的にも意義がある。とりわけ、緊急治療室環境における菌株や菌種の同定は、患者の感染症に効果的な抗生物質を選択するために重要である。害をなす細菌の確認方法として現在行われているのは2~3日間の培養である。その結果、菌種と菌株の両方が同定される。この情報が得られるまで、患者は多くの場合その生命を維持するためにさまざまな種類の抗生剤による治療を受ける。だが実際にはこのことが耐性菌の発達可能性を高めてしまっている。数時間で菌を同定するラマン分析の潜在能力は、生きるか死ぬかの問題に対処するだけでなく、耐性菌の発達を最小限に抑えるものとなり得る。ラマン分光法による細菌の種や株の同定を可能とするためには、関連する生物のスペクトルのデータベースを収集し、利用できる状態にしなければならない。スペクトルの収集などは標準化(例：コロニーの齢数や培養栄養物も記録する)の必要があるほか、多変量解析アルゴリズムに対しては、良好な結果を得られるか厳格なテストが必要になる。データベースは継続的に更新し、新しい抗生物質耐性菌が含まれるようにしなければならない。数々の著者がこの実現可能性について論じている<sup>[8-12]</sup>。また欧州連合はこのニーズに対処するためのコンソーシアムを結成した(hemospec.eu)。同コンソーシアムが提案する、最小サイズの血液サンプルから微生物を同定するプロトコルをFigure 1に示す。

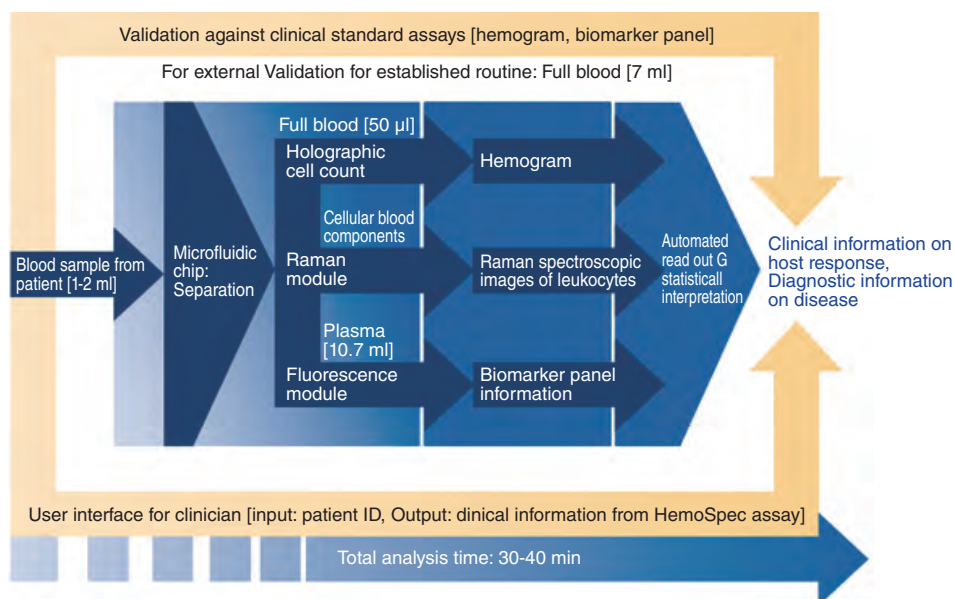


Figure 1 Scheme proposed by European Union for identifying infectious organism and preparing the best antibiotic defense. This figure is reproduced from <http://www.hemospec.eu/index.php/technology>.

すでに挙げた文献のうち「Journal of Raman Spectroscopy」の2015年のレビュー論文<sup>[12]</sup>で、環境、食品汚染物質、医療における、微生物の同定に関する数々の応用例の概要がまとめられている。その論考では人体の安全に対して一定の意義を持つ、非医療目的の応用についても触れられているが、その中には細菌性のバイオテロ物質、および食品・水病原体の検出も含まれている。この資料は非常に興味深いものではあるが、その大部分は短論文である本稿の目的からは外れているため、関心を持たれた読者には当該論文を直接ご覧になることを強くお勧めする。

このレビュー論文<sup>[12]</sup>では、高い感度と特異度\*1をもって、また場合により高スループットモードを用いて生物を同定するラマン分光法の複合的な応用例が紹介されている。これらの測定には微生物の参照スペクトルの膨大なデータベースと洗練された多変量アルゴリズムが必要であるという認識は重要である。例えば、病院での感染症アウトブレイク（通常発生しているレベル以上に感染症が増加すること）において、あるシステムのテストが行われ、「分離株の集合の内部におけるばらつきのスクリーニング」に有効であることが判明している。著者らは、ラマン分光法とマイクロ流体素子との統合によって高速/高スループットな細菌同定を実現するためのSERS（表面増強ラマン散乱）の応用についても精査している。いくつかの事例では、病原性細菌、菌類、ウイルスの病原体特異的な核酸シークエンスの検出にSERS法が使用されていた。とりわけ注意が払われたのが、体液中の病原体の検知（これも培養を伴わない）についての記述である。対象とされたのは尿、血液・血清、腹水（腹腔から出る液体）、唾液、脳脊髄液、涙液、および頸管粘液であった。また、皮膚と爪の感染モードも検討対象となった。抗生物質と細菌との相互作用を分析した刊行物も検証されている。例えば、ラマン分光法によるスペクトル波形によって、バンコマイシンに敏感な、または耐性を持つ細菌が識別できることが見出された。別の研究では、DNAのラマンバンドの検出を通じて、抗生物質の静菌作用と殺菌作用が識別された。この著者らは、最後のトピックとして、細胞内病原体の検出と、異なる代謝状態を示す標的細胞の内部と外部にある同じ病原体の識別における、ラマンスペクトルの有効性について概説している。

\*1：感度と特異度：臨床検査の有用性を評価する指標。両指標が高い（1に近い）ときは、その検査を行うだけで疾患の有無を判定できる。

## 疾患診断

疾患診断では、アテローム性動脈硬化、骨疾患、およびさまざまな形態のがんがその主要な領域とされてきた。

1992年にはマサチューセッツ工科大学のMichael Feldが

ヒトの動脈のラマンスペクトルを計測。これはアテローム性動脈硬化症の疾患経過についての組織化学的情報を抽出するための手段であった<sup>[13]</sup>。

その後、2006年には同じグループがアテローム性動脈硬化症と不安定プラークの病理学的in vivo評価を開始した<sup>[14]</sup>。2012年には、Jenaグループが、外径1 mmの内視鏡プローブを用いた、ウサギをモデルとするアテローム性動脈硬化プラークのin situ測定について論文を発表した<sup>[15]</sup>。脂質（飽和、不飽和、遊離脂肪酸およびエステル化脂肪酸。トリグリセリド類含む）やタンパク質について文献に記載されたバンドの帰属に基づき、大動脈管腔の各部の特徴付けが行われた。その目的は化学組成に基づいた不安定プラークの予知診断であった。ラマン分光測定に続いて、CARS（コヒーレント反ストークスラマン散乱）イメージの記録が、正常な大動脈とプラークが蓄積した大動脈を対象に行われた。CHの振動周波数がタンパク質と脂質とで大きく異なる（それぞれ $2930\text{ cm}^{-1}$ と $2840\text{ cm}^{-1}$ ）ことから、CARSイメージにおけるコントラストは非常に良好であった。

骨は、ヒドロキシアパタイト（鉱物の一種）とコラーゲン（タンパク質の一種）との複合材である。必要な機械的特性を得るために、骨は多孔質であり、常に破骨細胞と増骨細胞によって再構築（リモデリング）されている。これにより形成される骨単位は、環状の構造を持ち、骨の長軸に対して平行であり、同心の薄いミネラル層を有している。ミネラルと結合するOH<sup>-</sup>およびPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>サイトの一部は炭酸塩に置き換えられ、結晶化度はさまざまである。ミネラルとタンパク質の相対比、炭酸塩置換、およびミネラルの結晶化度は、すべてラマン分光法により測定可能なパラメーターであり、これらを用いて骨品質の特徴付けを行うことができる。1999年、ミシガン大学のMichael Morris教授が骨を対象とした初期のラマン分析について発表した。これは各コンポーネントの分光法における特徴を分析し、多変量解析の手法を応用してラインマップ（線分析）の解析を行い、皮質骨の化学的性質の検討に用いたものである<sup>[16]</sup>。（皮質骨とは長さのある骨の長手方向の中央部の緻密な骨をいう。）この発表内容において重要なのは、リン酸塩バンドの中央ラマンシフトが $951\sim 963\text{ cm}^{-1}$ となるミネラル相に関する3つの因子の発見である。Morris教授と彼のグループは以降も骨の研究、特に骨疾患の研究を継続している<sup>[17]</sup>。

その後、Ozan Akkusと共同研究者らが顕微ラマン分光法を用いてヒトの緻密骨の老化に関する研究を行った<sup>[18]</sup>。これは具体的には、17歳から73歳までの被験者の骨単位においてリモデリングされない骨と新たに形成される骨の組成を記録し、その壊れやすさについて把握するというものであった。前者（リモデリングされない骨）のミネラルの含有量は寿命の最初の20年間にわたり増加し、ミネラル結晶のサイズも増大した。一方、新たな骨は平均してタンパク質

対ミネラル比が大きく、結晶が小さめの状態を維持し、骨がより脆性の低い状態に保たれていた。当該論文には「リモデリングの速度が低下すると、ミネラル化した組織の割合が高くなり、骨の壊れやすさが増大する可能性がある」と述べられている。

**がん診断**への顕微ラマン分光法の応用の可能性について関心を持つ方々にとっては、2008年に出版されたとある書籍の章が良き出発点となるだろう<sup>[19]</sup>。その章は実際には膀胱と食道の疾患診断をもっぱら扱っているが、その2つの例に向けた手法の展開は、これらの組織種別に固有というよりも、むしろ他の模範としてとらえるべきものである。現在のがん診断の代表的な基準は、病理学者の結論をベースとしている。しかし、複数の病理学者が同じ標本を検証した結果、異なる結論にたどり着く場合があることは周知の事実である。このためラマン診断の開発手順には、150の生検標本の収集と、それらを分類のために病理学者の集団に提出する作業が含まれた。最終的には、意見の一致をみたくわずか50の標本がラマン法のための分類に使用された。正常な組織、噴門バレット組織、胃底バレット組織、腸管バレット組織、軽度異形成、高度異形成、腺がん上皮異形成および扁平上皮がんの平均スペクトルが示された。線形判別分析(Linear Discriminant Analysis : LDA)が判定のために適用され、3グループモデル(正常な扁平上皮粘膜、バレット食道、異形成およびがん)の感度および特異度はそれぞれ84~97%と93~99%であった。これらの値は病理学者たちと比べて遜色ないものであったが、診断の結果として臓器が摘出される場合、偽陽性は最小限に抑えたい。同時に、がん組織を見逃すことも避けたいものである。誤分類のコストを考慮することで誤診が改善された。

膀胱鏡検査時に切除された膀胱の標本も、上記に引用した食道がんの場合と同様の結果となった。さらに、これらの標本のスペクトルを、この膀胱疾患の病期分類、つまり腫瘍が膀胱壁をどの程度浸潤しているかの判定に用いることが可能であることがわかった。もちろん究極的には、即時に判断を下すために現場のデータを提供したいと人は考えるものであるが、これはラマン内視鏡プローブの使用により可能となる。本件では、1本を芯に6本のファイバーを周囲に配置したバンドル構造で、励起ファイバーからのシリカのラマン信号と集光ファイバーからのレーザー信号を消去するフィルタリング機能付きのプローブが用いられた。Enviva Ramanプローブという名称の、Visionex社の製品である。生体外標本に再びLDAアルゴリズムが用いられ、良性の標本(正常および膀胱炎)が移行期の細胞がんとして区別された。全体の精度は84%であった。この原理の証明は、手術室環境における生体内測定の可能性を支持するものである。

2008年に書かれたこの章の最後に、著者らはラマン分光法

をがんの診断に応用する際の注意点を指摘している。まず、スペクトルの差異が極めて微小であることから、スペクトルをいくつかの構成部に分解し、疾病過程を理解しやすくすることが有用と考えられる。良性の組織を新生物組織と区別する際には、多変量解析手法が用いられた。だが、1つの機器に集められたスペクトルに基づくモデルを、別の機器に集められたスペクトルによる組織の状態予測に用いることができるのかという疑問が、少なくとも本稿執筆時点においては残ったままである。機器の応答に対し、広帯域の光源に基づきスペクトルを補正することは確かに可能だが、さまざまなスペクトル分散を提供する(スペクトル分解能が異なる)機器によってスペクトルが集積された場合、幅が異なるバンドの相対強度は、スペクトルの分散に応じて変化する。この現象については、我々が知る限り対応がなされていない。

2015年、Stone教授のグループは、がん診断に関する別のレビュー論文を著している<sup>[20]</sup>。彼らはさまざまな種類の腫瘍(脳、乳、肺、皮膚、食道、前立腺、直腸結腸、および骨)に対するがん診断に加えて、がんやその他のコンディションのための体液診断分析についても考察を加えており、この論文では腫瘍境界の判定という重要な事柄について取り上げている。手術室において、境界判定のために患者の腫瘍全体の完全なスペクトルイメージング・データを収集することは、必要な時間を考えれば法外な行為である。だが、スポット間の変動を探ることで試料採取箇所を減らすアルゴリズムが既に開発されている。これは脳組織の除去において特に重要といえる。再発の確率を最小化するために腫瘍を極力取り除きつつ、神経学的欠損を避けるために健康な組織を除去しないようにすることが望ましいためだ。この論文ではCARS(コヒーレント反ストークスラマン分光法)やSRS(誘導ラマン分光法)、SERS(表面増強ラマン分光法)およびTRS(透過ラマン分光法)といったその他の測定手法もレビュー対象となっている。

この論文に引用された研究の一部では、ラマンスペクトルと多変量解析手法の併用によって、予知分析が可能であるだけでなく、ラマンスペクトルによって分子と疾患との相関関係を知ることができる場合もあることが示されている。例えば非小細胞肺癌において、健康な組織ではポルフィリンの濃度が高いが、腫瘍組織ではDNAバンドが高くなることがわかった。別の引用研究では、自家蛍光の内視鏡測定によって識別された疑わしい領域が、その後ラマン分光法により91%の特異度で新生物発生前組織であると特定された。

皮膚がんに関する議論では、スペクトルを用いた腫瘍境界の定義が、コストのかかるモース顕微鏡手術に代わるものとして検討された。基底細胞がん(最もよくみられる皮膚がんの一種)を正常な組織と区別する際、分類モデルには

核酸に割り当てられるバンドの相対強度が用いられ、感度は $90 \pm 9\%$ 、特異度は $85 \pm 9\%$ であった。

腫瘍境界評価へのラマン分光法の使用を最初に探求したのは、Michael Feld教授の研究グループであった<sup>[21]</sup>。教授はとりわけ、病理学による悪性状態の確認後に再手術が必要となった、目に見えないがんを持つ1人の患者を特定している。最近では、ラマン分光法による灰白質、白質、壊死、および病理性膠芽腫の識別が可能であることが示された<sup>[22, 23]</sup>。第1の文献<sup>[22]</sup>では、小型のポータブル分光器に接続された $6 \times 1$ ファイバースコープを用いて測定を行っている。測定では、ラットの脳に発生させた腫瘍にプローブを接触させた。この研究の目的は「手術中のリアルタイムな脳生検を可能にする生体内ラマン分光法を構築するための」プロトコルの開発であった。同研究やその他の研究において、腫瘍の成長が脳組織の脱髄に引き続いて脂質の減少を引き起こすことが判明した。第2の文献<sup>[23]</sup>では、タンパク質と脂質に割り当てられているバンドが画像化され、言及された各相を識別できることが見出された。またこれらの画像はH&E染色<sup>\*2</sup>された近隣の組織切片と相関していた。

とりわけ興味深いのが、ラマン分光法による**体液の直接診断分析**の可能性である。我々が取り上げている参考文献20には、その可能性が存在する6つの領域について触れられている。すなわち、糖尿病および血糖値モニタリング、がん診断、喘息、炎症、血中の凝固・抗凝固因子、そしてマラリアである。2008年にはChanらにより、レーザートラッピングを利用することで個別の白血病細胞のスペクトルが取得できることが実証された<sup>[24]</sup>。健康人と白血病患者から採取したB細胞・T細胞両方の集団が調べられた。DNAおよびタンパク質マーカーががんの発見に役立つ優れた識別力を持つことが確認された。マーカーの検証とスペクトルの分類には主成分分析(Principal Component Analysis : PCA)とLDAの2つが用いられた。

しかし最も重要なのは、マイクロ流体素子の光学トラップにおける、単一細胞のラマン分光分析の併用である<sup>[25]</sup>。これによってラマン分光技術と標準の流体評価法の統合が可能になると予想される。増強メカニズム(悪性細胞を標的とするSERSタグやSRS, CARSなどのコヒーレントなプロセス)と組み合わせることにより、循環体液中の単独の転移細胞を発見できる可能性がある。

\*2: 組織を形態観察する目的で、細胞核と細胞質を染色する手法

## ラマンイメージング

組織学は組織の生理学的状態の評価を目的として発展してきたが、組織、細胞および細胞小器官の生化学的状態の評

価手段としては間接的である。ラマン分光法は、生物学や生物医学の主要な手法として、これまでに何度もその有効性を実証してきた。イメージングとマッピングはいずれも、生体外・生体内共に広く用いられている、病変などのさまざまな生物医学の諸問題の分析アプローチである。ラマン分光法は単一細胞から組織レベルまで応用可能であり、構造や機能に関する情報を非破壊的かつ標識を用いない方法で取得することができる。

この節では、バイオイメージング手法としての顕微ラマン分光法の主なメリットを指摘したい。すなわち、標識を用いず非侵襲的であること、分解能が高いこと、高度な多量データ処理手法が使用できることである。また、細胞生物学および組織がん医療の分野における応用事例を挙げる。すでに細胞や組織のような複雑な構造を持つ生物試料の解析に用いられる顕微イメージング手法は数多く存在しており、例えば光学顕微鏡法や、共焦点レーザー走査顕微鏡法、走査電子顕微鏡法(SEM)、原子間力顕微鏡法(AFM)などがある。しかし、こうした手法では非常に詳細な画像が得られるが、検査中に試料の化学的状態や組成の特徴を明らかにすることはできない。それを可能にするのが分光的手法である。特にラマン顕微分光法は、マイクロメートルレベルで細胞の生化学的性質を調べる手段として急速に確立されつつある。共焦点ラマン顕微鏡の開発により、光学顕微鏡の空間分解能でこのような詳細な化学情報が取得可能となっている。したがって、細胞や組織の化学的性質の検証、およびマッピングイメージの作成を迅速に行うことができる。これらのイメージには、画素ごとにスペクトル情報が含まれており、構成要素の分布をラマンスペクトルに基づいて可視化することができる。倒立顕微鏡を用いた測定機器の出現により、この手法は生物学者の研究領域で使われはじめた。

ラマンスペクトルイメージングおよびマッピングはバイオメディカルの世界で幅広く受け入れられている。これは第1に水のラマンスペクトル強度が非常に弱い(生体試料の多くは75%以上の水を含んでいる)、第2に試料の化学的・物理的構成に関する高度な情報が得られるためである<sup>[26]</sup>。ラマンイメージまたはマップから得られる大量の情報から主要パラメーターを識別し取得するためにはケモメトリックス(多変量解析:MVA)を分析の主要なツールとして用いる<sup>[27-30]</sup>。方法論的な視点から重要となるのは、ラマンマッピングとラマンイメージングとの区別である。マッピングは、試料上の対象領域を規定する座標 $(x, y)$ の各地点でスペクトルを測定することによって実現する<sup>[28]</sup>。この方法によって、マッピングされた各地点の詳細な化学情報が取得できる。ラマンイメージングでは、特定の波数にて試料表面をほぼ同時に解析することが可能となる。実際には、選択された波数範囲にわたり小刻みに波数を変えてラマンイメージは測定される<sup>[31]</sup>。ラマンマッピングの性能

をラマンイメージングと比較した場合、取得時間がマッピングではかなり長くなるのが通常指摘される。これはマッピング領域内の各地点におけるスペクトルが個別に測定されるためである。しかし、公平に時間を比較した場合には、各波長において多くのラマンイメージが収集されることになるため、こうした時間差が小さくなることに留意しなければならない。もっとも、技術の進歩に伴い、マッピングの時間的制約はそれほど問題にならなくなってきている<sup>[32]</sup>。

ラマンマップに用いられてきた多変量解析法には、PCA、判別成分分析(Discriminant Component Analysis : DCA)、部分最小二乗法(Partial Least Squares : PLS)、多重最小二乗法(Multiple Least Squares : MLS)、および古典的的最小二乗法(Classical Least Squares : CLS)などがある。これらはすべて単一のピークではなく完全なスペクトルパターンを用いてスペクトルの差異を抽出するものである。多変量解析のアルゴリズムには、ユーザーが純粋スペクトルの知識をあらかじめ持っている場合(教師あり<sup>\*3</sup>)と、ユーザーがそうした知識を持たず、アルゴリズムに差異を示す因子を「発見」させる場合(教師なし<sup>\*3</sup>)とがある。

高品質のラマンイメージの取得に際しては、自家蛍光の存在が重大な障害となる。これはラマン散乱よりも高効率の(光強度が強い)プロセスであることが多いからである。この蛍光の影響を低減するさまざまな方策が生み出されてきたが、その中には深紫外<sup>[33]</sup>または近赤外<sup>[34]</sup>レーザー励起を用いるものや、シフト励起ラマン差分光法、誘導ラマン散乱(SRS)、そして取得後に適用される数々の処理法が含まれる。また他には、ラマン分光法に自家蛍光分光法や拡散反射法を組み合わせる手法もある。

**\*3** : 統計学の用語。supervise (教師あり), unsupervise (教師なし)。

### 単一細胞の分析

一例として、ミュンスター大学病院の生殖医療・男性病学センターのCon Mallidis教授と共同研究者らは、精子細胞の研究を行った。彼らは、精子のDNAと、これらに紫外光(UV)を照射した際の影響に関心を寄せていた<sup>[35]</sup>。この研究の目的は、正常な細胞と生殖力のない細胞における精子核DNA (nDNA)の状態(UV照射の影響)をラマンイメージ

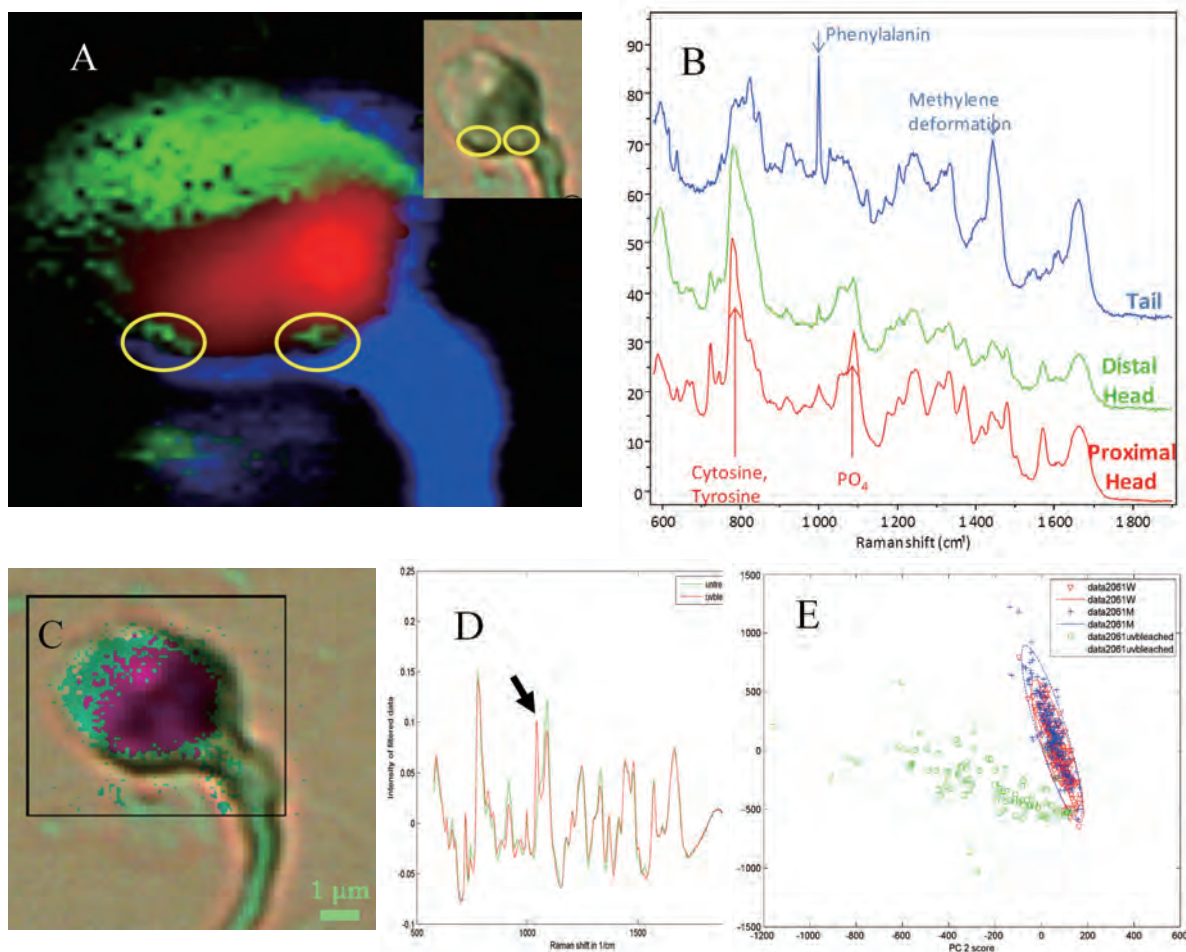


Figure 2 (A) (B) Raman map and the characteristic Raman spectra of native sperm (the video image of the sperm in the inset). Three distinct regions in the sperm are observed: proximal head, distal head and tail, as well as small details as vacuoles. (C) Overlay of human sperm showing the locations of spectra found to be indicative of intact (purple) and damaged (aqua) DNA. (D) Averaged spectra showing the distinct shift at 1042  $\text{cm}^{-1}$  (arrow) in spectra of irradiated (red) compared with that of the untreated human sperm (green). (E) Scores cluster plot derived from PCA: native sperm (red and blue, for two observers) and UVB-irradiated sperm (green).

ング手法を用いて分析し、結果をすでに確立されている nDNA 試験と比較することであった。

合成石英 (Suprasil) 製顕微鏡スライドに塗布され空気乾燥させたヒトの精子に対し、高空間分解能のマッピングが行われた。化学的特徴に応じてそれぞれに固有の色を割り当てることで、精子細胞の各部の識別を可能とした (Figure 2A, 2B)。イメージの作成には CLS が用いられた。3つのはっきりとした化学的プロフィール (スペクトル) が

特定され、これらは頭部基部 (DNA を含む)、頭部先端部 (ア クロソーム)、そして精子の尾部 (鞭毛) に相当するもので あった。高い空間分解能で測定されたラマンマップからは、 空胞 (黄色の円) のような精子頭部における小さな異常を検 出することができた。

この未処理 (ネイティブ) の精子細胞が、nDNA に変化を与 える意図で UV を照射された精子細胞と詳細に比較された。 標準的な PCA 分析が、「ネイティブの精子 / 観察者 W」「ネ

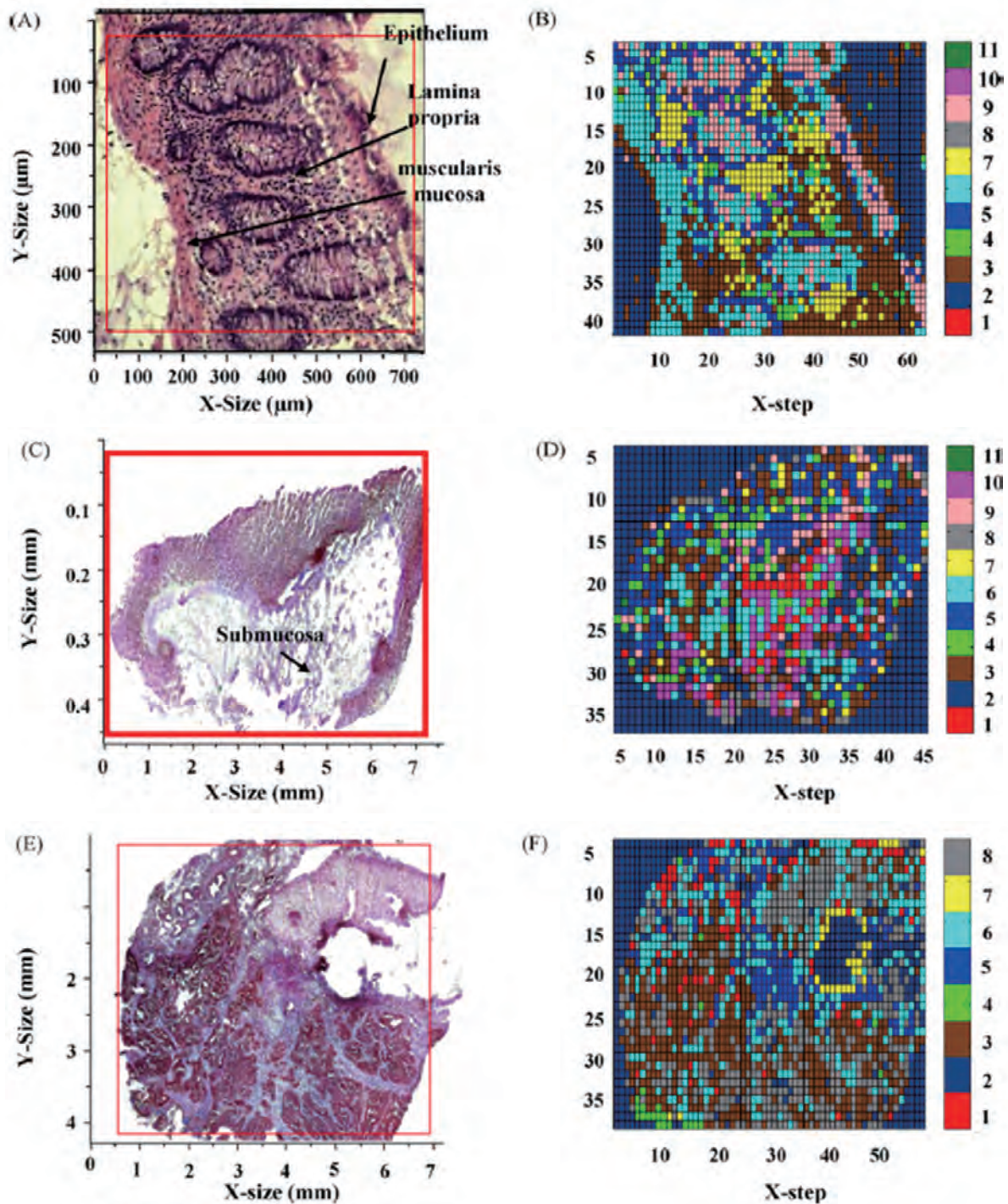


Figure 3 Histopathologic HE-stained section of normal (A and C) and of adenocarcinomatous (E) colonic tissues; B, D and F display pseudo-color Raman maps based on 11-means cluster (B and D) and 8-means cluster (F) on the same areas of the adjacent unstained section. Each cluster (consisting of similar spectra) was assigned to one color and corresponded to the extracted model.

イティブの精子／観察者M]および「損傷した精子」の3つのデータセットに対し行われた。その結果、異なる観察者によるネイティブの精子に対する測定値の間に差異は認められなかったが、これらの値とUV-B処理後に取得された測定値との違いは明確であった(Figure 2E)。スペクトル的には、ネイティブの精子サンプルとUV処理されたサンプルの主な違いはDNAの $\text{PO}_4^{3-}$ 振動バンドと関連がある(Figure 2B)。この違いはUV-Bにより引き起こされたヌクレオチド塩基の二量化\*4を示している。スペクトルシフトを利用すれば、単一細胞中の損傷したDNAと無損傷のDNAの分布を可視化することができる(Figure 2C)。

\*4：二量化は、隣り合った塩基間に結合ができたことにより生じる。

### 生体外組織検査

がん研究と患者のケアにおいて、従来の診断方法は病理組織学的染色と(訓練された)人間の目(病理学者)をベースとしている。しかしこのような方法では、顕著に異なる健康状態しか識別できない場合が多い。ラマン分光法を用いれば、詳細な化学情報によって組織の状態のより微妙な違いを見つけることが可能であり、既にラマン顕微分光法による診断の成功が多数報告されている。この分析法により、組織が癌性であるか否かについて、非常に迅速かつ再現性のある判定ができるだけでなく、腫瘍の成長段階やその悪性度を明確に示すことも可能となる。

フランス・ランス大学のManfait教授と共同研究者たちは、ラマン顕微分光法の力をライフサイエンスの分野で活かすべく取り組んできた。最近の研究ではラマン分光法を医学に応用し、ヒトの結腸における正常な組織と腺がん性組織との識別に力を入れている<sup>[36]</sup>。これらの腫瘍は特に侵襲性

が高く、広がるのが早いために、これを除去しようとする旧来の外科技術の手を逃れてしまうことも多い。

Figure 3に、無染色の正常な結腸組織と腺がん性の結腸組織の切片のマップ化されたラマンイメージングの結果を示す。

この分光分析データは代表的な病理組織学的手法と関連付けられた。PCA、クラスター分析(Clustering Analysis : CA)、多重最小二乗法(Multiple Least Squares algorithm : MLS)といった多変量統計解析を使用して、結腸を構成する個々の物質(タンパク質、脂質、コラーゲン、核酸、および粘液)における分子変化の空間分布の調査が行われた。Figure 4のイメージはそれぞれ、結腸標本中の正常な組織と腺がん組織におけるタンパク質、コラーゲン、脂質および粘液の分布を示している。

著者らの所見によると、健康な組織ではタンパク質が粘膜中に存在する一方、脂質とコラーゲンは粘膜下層に集まっており、粘液が組織を包囲している。また、基質により分離された組織の腫瘍部にはDNAが高度に分布し、組織周辺に粘液が存在していることがわかる。使用した多変量解析手法(MLS)によって、腺がん組織に脂質が存在しないこと、基質の周囲にコラーゲンが存在することが裏付けられている。

これらのイメージング分析から得られる重要なメッセージは、組織学的・形態学的なエビデンスが得られない悪性腫瘍の初期段階において生じる分子変化をも、顕微ラマン分光法が識別できるということである。

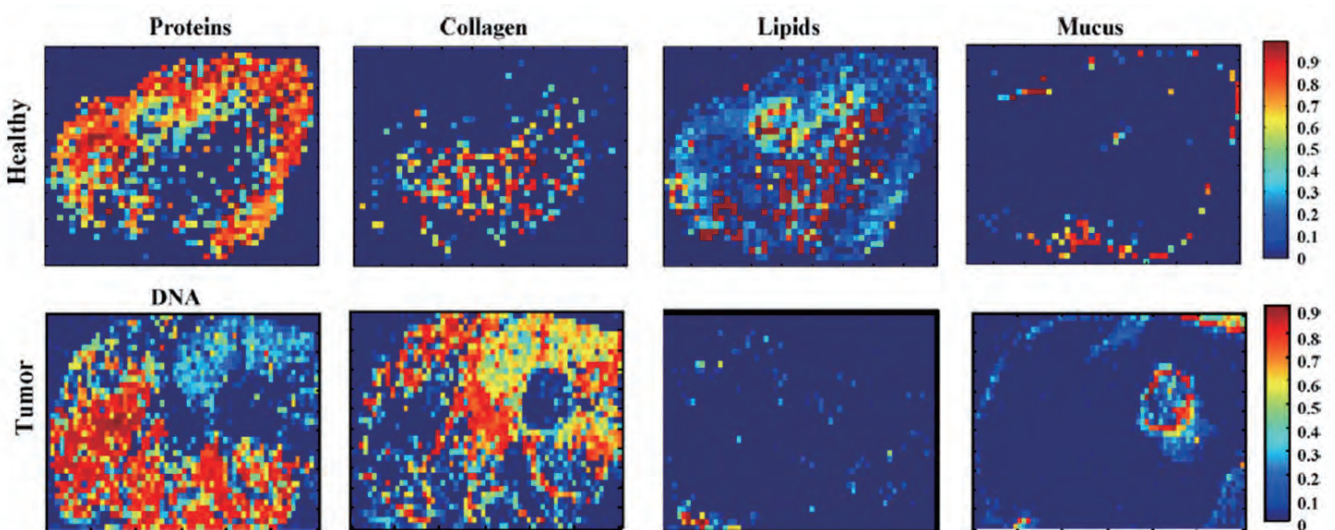


Figure 4 Biochemical distribution of the individual constituent (proteins, collagen, lipids, DNA, and mucus) between normal, adenocarcinoma colonic tissues produced by applying the MLS algorithm. To determine the molecular composition of tissue composition, the relative scattering intensities of the various components were normalized to add up to 100%. The spatial and biochemical information obtained from these maps can be used to identify which biochemical markers could discriminate between normal and cancer tissues



## おわりに

細菌種や株の同定, 疾患診断, そして分子マッピングへのラマン分光法の応用を概説してきた。本稿ではこの分野の人々, 特に特定の領域を最初に探索した人々の功績を紹介すべく努めた。しかし同分野は急速に拡大しつつあり, ここに挙げた参考文献を少し調べれば, この10年間におびただしい数の論文が発表されていることがわかる。よって本稿も, ラマン分光法の可能性がどのようなものかを理解するための入門書としてとらえていただきたい。

## 参考文献

- [1] Z. Movasaghi, S. Rehman, and I.U. Rehman, Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.* 42, 493-541(2007)
- [2] G.J. Puppels, F.F.M. Demul, C. Otto, J. Greve, M. Robertnicoud, D.J. Arndtjovin and T.M. Jovin, Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy, *Nature* 327, 301-303, 1990
- [3] K.C. Schuster, I. Reese, E. Urlaub, J.R. Gapes and B. Lensl, Multidimensional Information on the Chemical Composition of Single Bacterial Cells by Confocal Raman Microspectroscopy, *Anal. Chem.*, 72, 5529-5534(2000)
- [4] W.E. Huang, R.I. Griffiths, I.P. Thompson, M.J. Bailey and A.S. Whiteley, Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells, *Anal Chem.* 76, 4452-4458(2004)
- [5] W.E. Huang, K. Stoecker, R. Griffiths, L. Newbold, H. Daims, A.S. Whiteley and M. Wagner, Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function, *Environmental Microbiology* 9(8), 1878-1889(2007)
- [6] M. Li, J. Xu, M. Romero-Gonzalez, S.A. Banwart and W.E. Huang, Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging, *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 56-63(2012)
- [7] Y. Song, H. Yin and W.E. Huang, Raman activated cell sorting, *Curr Opin Chem Biology* 33, 1-8,(2016)
- [8] K. Maquelin, C. Kirschner, L.P. Choo-Smith, N. van den Braak, H.P. Endtz, D. Naumann and G.J. Puppels, Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy, *J. Microbiol Methods* 51, 255-271(2002)
- [9] M. Krause, B. Radt, P. Rosch and J. Popp, The identification of single living bacteria by a combination of fluorescence staining techniques and Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 38, 369-372(2007)
- [10] M. Harz, P. Rosch, J. Popp, Vibrational Spectroscopy - A Powerful Tool for the Rapid Identification of Microbial Cells at the Single-Cell Level, *Cytometry A*, 75A,104-113(2009)
- [11] J.F.M. Almarashi, N. Kapel, T.S. Wilkinson and H.H. Telle, Raman Spectroscopy of Bacterial Species and Strains Cultivated under Reproducible Conditions, *Spectroscopy: An International Journal* 27, 5-6, 361-365(2012)
- [12] S. Stockel, J. Kirchhoff, U. Neugebauer, P. Rosch and J. Popp, The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms, *J. Raman Spectrosc.* 47, 89-109(2016)
- [13] J.J. Barage, M.S. Feld, and R.P. Rava, In Situ Optical Histochemistry of Human Artery Using near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 8, 3473-3477(1992)
- [14] J. Motz, M. Fitzmaruice, A. Miller, S. Gandhi, A. Haka, L. Galindo, R.R. Dasari, J. Kramer, and M. Feld, In vivo Raman Spectral Pathology of Human Atherosclerosis and Vulnerable plaque, *J. Biomed. Opt.* 11, 2, 021003(2006)
- [15] C. Matthaus, S. Dochow, G. Bergner, A. Lattermann, B.F.M. Romeike, E.T. Marple, C. Krafft, B. Dietzek, B.R. Brehm and J. Popp, In vivo Characterization of Atherosclerotic Plaque Depositions by Raman-Probe Spectroscopy and in Vitro Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopic Imaging on a Rabbit Model, *Anal. Chem.* 84, 7845-7851(2012)
- [16] J.A. Timlin, A. Carden and M.D. Morris, Chemical Microstructure of Cortical Bone Probed by Raman Transects, *Appl. Spect.* 53, 11 1429-1435(1999)
- [17] G.S. Mandair and M.D. Morris, Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength,

- BoneKEy Reports 4, Article #620(2015)
- [18] O. Akkus, A. Polyakova-Akkus, F. Adar and M. Schaffler, Aging of Microstructural Compartments in Human Compact Bone, *J. Bone and Mineral Res.* 18, 6 1012-1019(2003)
- [19] N. Stone, C. Kendall and H. Barr, Raman Spectroscopy as a Potential Tool for Early Diagnosis of Malignancies, pp. 203-230, in *Esophageal and Bladder Tissues*, in *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, Ed. M. Diem, P.R. Griffiths and J.M. Chalmers, John Wiley ISBN 978-0-470-01214-7(2008)
- [20] K. Kong, C. Kendall, N. Stone and I. Notingher, Raman spectroscopy for medical diagnostics – from in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection, *Adv. Drug Del Reviews*, 89 121-134(2015)
- [21] A.S. Haka, Z. Volynskaya, J.A. Gardecki, J. Nazemi, J. Lyons, D. Hicks, M. Firzmaurice, R.R. Dasari, J.P. Crowe, and M.S. Feld, In vivo Margin Assessment during Partial Mastectomy Breast Surgery Using Raman Spectroscopy, *Cancer Res* 66, 6 3317-3322(2006)
- [22] A. Beljebbar, S. Dukic, N. Amharref and M. Manfait, Ex vivo and in vivo diagnosis of C6 glioblastoma development by Raman spectroscopy coupled to a microprobe, *Anal Bioanal Chem* 398, 477-487(2010)
- [23] R. Kast, G. Auner, S. Yurgelevic, B. Broadbent, A. Raghunathan, L.M. Poisson, T. Mikkelsen, M.O. Rosenblum and S.N. Kalkanis, Identification of regions of normal grey matter and white matter from pathologic glioblastoma and necrosis in frozen sections using Raman imaging, *J. Neurooncol* 125, 287-295(2015)
- [24] J.W. Chan, D.S. Taylor, S.M. Lane, T. Zwerdling, J. Tuscano and T. Huser, *Anal. Chem.* 80, 2180-2187(2008)
- [25] S. Dochow, C. Krafft, U. Neugebauer, T. Bocklitz, T. Henkel, G. Mayer, J. Albert and J. Popp, Tumor cell identification by means of Raman spectroscopy in combination with optical traps and microfluidic environments, *Lab Chip* 11, 1484-1490 (2011)
- [26] J.J. McGarvey and J. Renwick Beattie, Raman Imaging, Chapter 7, *Raman Microscopy : A Versatile Approach to Bio-Imaging*, ISBN 978-3-642-28251-5, 2012
- [27] J. Renwick Beattie, Josephine V. Glenn, Michael E. Boulton, Alan W. Stitt, John J. McGarvey, Effect of signal intensity normalization on the multivariate analysis of spectral data in complex 'real-world' datasets, *JRS*, Volume 40, Issue 4, April 2009, Pages 429–435
- [28] Clark D, Sasić S. Chemical images: technical approaches and issues. *Cytometry A*. 2006 Aug 1; 69(8): 815-824.
- [29] Lavine B, Workman J. Chemometrics. *Anal Chem.* 2008 Jun 15; 80(12): 4519-31
- [30] Gendrin C, Roggo Y, Collet C. Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Nov 4; 48(3): 533-553
- [31] Schlücker S, Schaeberle MD, Huffman SW, Levin IW. Raman microspectroscopy: a comparison of point, line, and wide-field imaging methodologies, *Anal Chem.* 2003 Aug 15; 75(16): 4312-8
- [32] Krafft C, Knetschke T, Funk RH, Salzer R. Studies on stress-induced changes at the subcellular level by Raman microspectroscopic mapping. *Anal Chem.* 2006 Jul 1; 78(13): 4424-9
- [33] Bykov S, Lednev I, Ianoul A, Mikhonin A, Munro C, Asher SA. Steady-state and transient ultraviolet resonance Raman spectrometer for the 193-270 nm spectral region. *Appl Spectrosc.* 2005 Dec; 59(12): 1541-1552
- [34] Huang Z, McWilliams A, Lui H, McLean DI, Lam S, Zeng H. Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer, *Int J Cancer.* 2003 Dec 20; 107(6): 1047-1052.
- [35] C. Mallidis, J. Wistuba, B. Bleisteiner, O.S. Damm, P. Groß, F. Wubbeling, C. Fallnich, M. Burger, and S. Schlatt, In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy, *Human Reproduction*, Vol.26, No.7 pp. 1641–1649, 2011
- [36] A. Beljebbar, O. Bouché, M.D. Diébold, P.J. Guillou, J.P. Palot, D. Eudes, M. Manfait, Identification of Raman spectroscopic markers for the characterization of normal and adenocarcinomatous colonic tissues, *Critical Reviews Oncology/Hematology* 72(2009)255–264



### Fran ADAR, Ph.D.

Worldwide Raman Applications Manager  
HORIBA Instruments Inc.



### Catalina DAVID, Ph.D.

Application Scientist  
HORIBA FRANCE SAS



### Marinella SANDROS, Ph.D.

Business Development Manager for Life Sciences  
SPRI Product Manager  
HORIBA Instruments Inc.