

# 研究報告書

## 「ラマン分光スパース解析による生細胞の包括的分子イメージング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 安藤 正浩

### 1. 研究のねらい

本研究は、脂質、タンパク質、核酸、糖質、リン酸、酵素、色素、代謝産物などの包括的・探索的分子分析を、生細胞などの生体試料において、非破壊分析する技術基盤を構築するものである。細胞や細胞集団、生体組織など、生体試料において、非破壊・ラベルフリー（非染色）で包括的な分子定量解析を行うことができれば、個々の細胞の個性を解析できるのみならず、他の分析化学的技術や遺伝子解析と組み合わせた統合理解や、その細胞の個性に応じた細胞分取も可能となり、様々な基礎生物学・医学臨床応用につながることを期待される。

本研究では、ラマン分光法と情報科学技術の高度融合により、上記目的を達成することを目指した。ラマン分光法は、まさに非破壊・ラベルフリーで、構成分子の同定・定量を行うことができる分光手法である。顕微鏡下での分子イメージングではサブ $\mu\text{m}$ の空間分解能を持って細胞・生体組織を時空間分解解析することが可能である。そして、得られるラマンスペクトルには原理的に測定試料を構成するすべての分子についての情報が含まれている。そのため近年、生物・医学臨床応用において注目を集めてきており、例えば、病原菌の識別や癌診断などに、ラベルフリーの簡便な分析手法として応用研究が進められている。しかし一般に、生体試料の構造的、分子組成的な複雑さから、そのラマンスペクトルは多数の分子スペクトルの重ね合わせとなってしまうため、そこから最大限の分子科学情報を引き出す技術はまだ十分に確立していないのが現状である。

そこで、本研究では情報科学技術の高度融合により、物理的に理にかなう拘束条件を課し、情報科学手法を融合することで、包括的、かつ自動的に、実測スペクトルの物理的解釈可能なスペクトルへの分解、及びそれに対応する分子種の帰属同定を行う革新的なラマン顕微分光計技術の確立を目指した。生体試料の不均一な構造情報、異なる細胞種などに起因する構成分子の違いなどの物理的考察に基づき、本研究ではスパース性に基づく行列分解などを活用した。さらに、生体分子の標準スペクトルデータを導入したデータ解析を行い、それをラマン分光顕微鏡の自動測定システムに活用することで、生体分子の包括的・自動的な分子認識・定量イメージングの技術基盤構築を狙った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

生体試料由来のラマンスペクトルは、多数の分子スペクトルが重畳し、複雑なスペクトル形状となってしまうため、その理解に常に困難が伴ってきた。構成分子は多岐に渡り、また生体試料中で周りの分子からの影響を受けてスペクトルが変化することもあるため、候補となる分子の標準スペクトルデータを構築することも難しく、特に全ての候補を網羅することは不可能に近い。本研究では、標準スペクトルを活用しつつ、さらに他の物理的側面から理解できる拘

束条件も課した上で、情報科学技術をスペクトル解析に高度に融合することで、分子帰属が可能な形でのスペクトル分解の技術を構築した。

まず、本課題を解決するため、生体試料測定に十分な感度を持ち、安定したスペクトルが得られるラマン顕微分光計を構築し、代表的な生体成分標準物質のスペクトルを取得した。その上で、これら標準スペクトルに類似したスペクトル成分を積極的に検出、分離するスペクトル分解技術を構築した。複雑な実測スペクトルの中に、各種生体分子成分が、どの程度含まれているのかを解析できるようになった。これまでは分光研究者の経験によるところが大きかった分子帰属が、計測と共に自動的に達成できる道筋が見えてきた。

さらに本研究では、標準スペクトルの活用に加え、他の拘束条件も課すことで、より自動的にスペクトル分解が可能となるよう、情報解析の高度融合を図った。生体試料中では各種分子がある程度局在して分布していること、自家蛍光バックグラウンドはラマンバンドと比べ滑らかなスペクトルパターンを示していること、など物理的理解に基づいた拘束条件を課すことで、これを実現した。本手法により、標準スペクトルセットに不足している未知の分子成分でも、実際の分子スペクトルに近い形でのスペクトル抽出がし易くなった。それにより、計測試料における特異的なマーカー分子検出など、探索的研究にも繋がる技術を構築することができたと言える。

実際、本技術は、単一生細胞、動物組織切片、食品などにも応用が可能であることを確認し、各種分子イメージングが可能であることを示すことができた。これまで、生体ラマン解析では、スペクトルを数値的な差異でのみ判断することが大多数であったが、本技術により、分子科学的に議論が可能となってきたことで、基礎生物学や医学、薬学といった広い分野で実際に活用できる技術となることが期待できる。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「ラマン分光顕微鏡の構築と標準スペクトルデータ取得」

標準スペクトルを効果的に活用するためには、計測器の感度や安定性も重要である。本研究では、実際にラマン分光顕微鏡を自作し、それをを用いて研究開発を行った。スペクトル解析のモデル化の祭には、まずは安定した装置での評価を優先し、光学システムをできる限りシンプルな設計とすることでこれを実現した。本研究テーマでは、脂質、タンパク質、核酸、糖質、リン酸、酵素などの代表的なスペクトルを、計 218 種類、標準化合物を測定することにより取得した。理想的には、固体状態や水溶液状態など、異なる状態における標準物質スペクトルを取得した方が、後の解析において有利になるが、生体化合物の場合、量が希少なものや、水への溶解度が低いものなども多いため、最低限、固体状態のサンプルを測定した。十分な濃度の水溶液が調整可能なものについては、併せて水溶液状態のスペクトルも取得し、水由来のバックグラウンドを差し引くことで、標準スペクトルを得た。物質の存在状態によってスペクトルは変化するが、タンパク質や核酸、多糖類など、分子量の大きな物質は、もともとのバンド幅が大きいことなどから、固体状態と溶液状態でスペクトルにそれほど大きな違いは見られず、固体状態のスペクトルを用いても解析に十分利用でき得ることを確認した。

### 研究テーマ B「分子自動認識プログラムの開発」

本研究の主題である、包括的・自動的なスペクトル分解イメージングのプログラムを構築することが本項目の狙いである。前項で測定した標準スペクトルを既知スペクトルとして用い、非負値行列分解をスパース正則化項と共に適用することで、多数の分子由来のスペクトルが重なり合った複雑な実測スペクトルからでも、自動的に分子同定が可能なスペクトル分解が可能となった。但しこれは、実測スペクトルに自家蛍光などのバックグラウンドスペクトルの干渉が見られない場合に適用できることであり、一般的な生細胞などの測定にはバックグラウンドの分離が問題となった。さらに、同一分子であっても、標準スペクトルと細胞中では存在状態、周囲の分子環境が異なるため、実測のスペクトルでは多少のスペクトルの変化が生じてしまうことも問題となった。これらを解決するため、解析アルゴリズムにさらなる改良を加えた(研究成果 5(3)-2)。

まず、バックグラウンドの分離については、スペクトルパターンの特徴を考慮したスペクトル分解を施すことで実現した。ラマンスペクトルは一般的にバンド幅の小さな鋭いラマンバンドが多数見られるのに対し、自家蛍光スペクトルは計測している波数範囲においてはあまりピークを持たないブロードなスペクトルパターンを示す。従って、スペクトル分解の際、鋭いピークを持たない滑らかな成分を、鋭い多数のピークを持つラマンスペクトルとは分離してスペクトル分解するようにアルゴリズムを構築した。また、標準スペクトルと実スペクトルの差異に関しては、標準スペクトルを完全に固定した辞書スペクトルとして用いるのではなく、標準スペクトルを初期値に設定し、そこからスペクトルの類似性を拘束条件に課した上で、スペクトルを最小二乗的に最適化する方針をとることで、問題を解決した。これらの新しいアルゴリズム構築により、これまで困難であったバックグラウンド干渉の強い生細胞からの複雑なスペクトルについても、自動的に分子同定できる形で、スペクトル分解が可能となった。大腸菌由来のスペクトルセットに対し、本手法を施した結果が図 1 である。

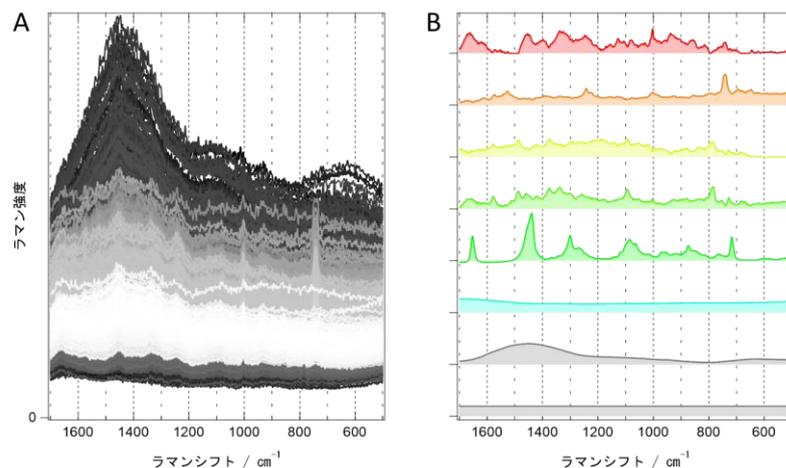


図 1. (A) 大腸菌生細胞のマッピング測定から得られたラマンスペクトル。(B) 本研究で開発したスペクトル分解手法により抽出されたラマンスペクトル。元々の複雑なスペクトルに寄与していた、タンパク質、酵素、核酸(DNA、RNA)、脂質、及び自家蛍光バックグラウンドが明瞭に分離された。

研究テーマ C「自動イメージング装置の構築と細胞・組織の分子解析」

上記、解析アルゴリズムを実際の装置に組み込み、顕微ラマン分光計によるマッピング測定と、分子イメージングの画像構築を同時に行えるようにした。ラマン分光計測においては、一般的なラマン散乱強度の弱さから、計測に時間を要することが実際の応用に際し問題となってくる。本課題では、上記テーマA・Bで構築した、標準スペクトルを用いた多変量スペクトル分解のアルゴリズムを用いることで、計測対象サンプルの複雑さを評価し、解析により情報を補いつつ、より詳細にスペクトルを取得すべきところにのみ計測積算時間をかけるようにすることで、簡便に、短時間で、意味のある分子イメージング画像取得ができるようになった。本研究課題では、実際のサンプルとして、生細胞、組織切片、食品表面など種々サンプルをモデルとして解析アルゴリズムを評価し、実際に同定可能な形でスペクトルの抽出と、そのイメージングが可能であることを確認した。

ラマン分光顕微鏡技術では、これまで、スペクトルの複雑さから、数値的に差異を見出すにとどまることが殆どであった。本研究では、「情報科学」と「計測技術」の融合により、その中に埋もれていた「分子情報」を明瞭に抽出し、分子分布のイメージングが可能となることが示された。

### 3. 今後の展開

これまで「測定はできるが、分子科学的にはそれをどう理解すればよいか分からない」状態であることが多く、振動分光学を専門とする研究者の知識と経験に大きく依存してきたラマン分光計測が、より一般的な生物学的分子解析ツールとなっていくことが今後期待される。どのような分析技術にも、長所短所両面あるが、ラマン分光計測の最も大きな利点は、ラベルフリーで様々な分子種が同時に見えること、そして非破壊計測のため、他の手法との相補的な融合も可能であることが挙げられる。本研究の成果により、複雑なスペクトルを、分子科学的視点で理解ができるようになった。ラマン分光法は医薬生物・食品科学などの分野に広がりを見せているが、分子科学的な情報を得られるようになって初めて、他分析手法から得られる知識とも容易につなげることができるようになり、新しい生物学的発見や、確度精度の高い解析技術となっていくものと考えられる。

### 4. 自己評価

本研究は、生体試料から得られる複雑なラマンスペクトルから、包括的かつ自動的に、分子同定可能な形でスペクトル分解、及びそれに対応する分子分布イメージング技術の構築を行うことで、革新的なラマン顕微分光計技術を確立することを目的としていた。計測技術的には既存の技術を用い、その一般化、標準化を含む課題であったため、研究の設計としては当初から課題を精査し、それを着実に解決していく形で、研究が進められた。標準スペクトルの構築など、個人研究の規模と言うこともあり十分とは言えないところもあるが、基盤技術の構築という意味では、確かな達成をみることができたと考える。

本研究分野は、今後早急な産業化、標準化を実現すべき段階に入っている。これまでは分光研究者の知識と経験に大きく依存する技術であったが、本研究のような基盤技術の構築により、より広く、生体・医学・薬学・食品などの各分野で有効に活用できる分子解析ツールとして発展していくことが期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Hajime Okajima, Masahiro Ando, and Hiro-o. Hamaguchi. "Formation of "Nano-Ice" and Density Maximum Anomaly of Water." *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 2018, 91, 6 991-997.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Masahiro Ando and Hiro-o Hamaguchi. "Extraction of Molecular Information from Highly Overlapped Raman Big Data Obtained from Biochemical Samples." 4<sup>th</sup> Symposium on Week Molecular Interactions. 2019/05, 招待講演
2. Masahiro Ando, Chihiro Kato, Tomoko Hashimoto, Hiro-o Hamaguchi. "Multi-Component (n>10) Simultaneous Analysis of Supplement Tablet by Raman Multivariate Curve Resolution." *The 26th International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2018)*. 2018/08.
3. Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi. "Converting Medical Raman Big Data into a Clinical Data Sheet by Multivariate Curve Resolution Alternate Least Squares (MCR-ALS) Analysis." The International Conference on Clinical Vibrational Spectroscopy 2018. 2018/06
4. 安藤正浩. "ラマン分光スペクトル分解による生細胞のラベルフリー分子イメージング" 電気化学会第85回大会, 2018/03 招待講演
5. 安藤正浩. "ラマン分光・多変量スペクトル分解のR&Dへの応用" 平成29年度日本分光学会年次講演会, 2017/05 招待講演