

# 生体医学への応用に向けて進展する ラマン分光法

マリネッラ・G・サンドロス、フラン・アダル

ラマン分光法は、ラベルフリーで非破壊的に、生化学的特性をサブミクロンの空間分解能で評価できる。この性能は、生命科学に広く応用できる優れた解析能力をもたらす。

基礎または臨床研究にいる生命科学者は、多くの理由からラマン分光法に魅力を感じている。この技術は水分の寄与がほとんどなく、ラベルフリーな計測や生物学的試料のイメージングおよび同定が可能である。10年以上の時をへて、ラマン分光法が新たに進歩したことで、医療診断、細胞選別法、バイオ治療の開発など、多くの優れた生体医学分野で活用されている。

時に、異なる液滴の大きさ、起源、組成も決定できたと研究チームは報告した。ラマン分光法は「LDの生理学的あるいは病理学的な機能を研究するにあたり有益なツール」の可能性があるとチームは結論付けた。

## 異なるものを区別する

ラマン分光法は、目視では違いがわからない、さまざまな疾患と細菌を区

別するとき有用である。例えば全身性炎症反応症候群(SIRS)は、血液に細菌や他の病原体が感染することで起きるのが一般的にほとんどであるが(この場合は敗血症と呼ばれる)、重篤なトラウマや侵襲的な外科手術など非感染状況で起きる場合もある。患者を同定、階層化することは、タイムリーに適切な治療を行うために必要だが、これら2つの病因を区別するバイオマー

## 液滴形成プロセスを明らかにする

アテローム性動脈硬化、心臓病、糖尿病、高血圧、肝臓病などの生活習慣病に関する知見を得るためにデザインされたマウス研究では、ラマン分光法の有用性が証明されている<sup>(1)</sup>。これらの疾患ではしばしば、内皮細胞(動脈の内側の露出層)の機能障害や、大きさが20~100nmの脂肪滴(LD)が関与しており、これらは炎症性疾患を示唆するものである。研究者は、肝臓の状態を3つに分けたとき(健常、硬化症、糖尿病)における細胞内の脂肪分布を特徴付けるためにラマン分光法を使用し、肝臓の脂肪組成は食事に反映されること、例えば高脂質の食餌を薬剤(メトホルミンとペリンドプリル)を摂取したマウスではLDが飽和することを発見した。

ラマン分光法によって、内皮細胞におけるLD形成の初めての3D検出と同

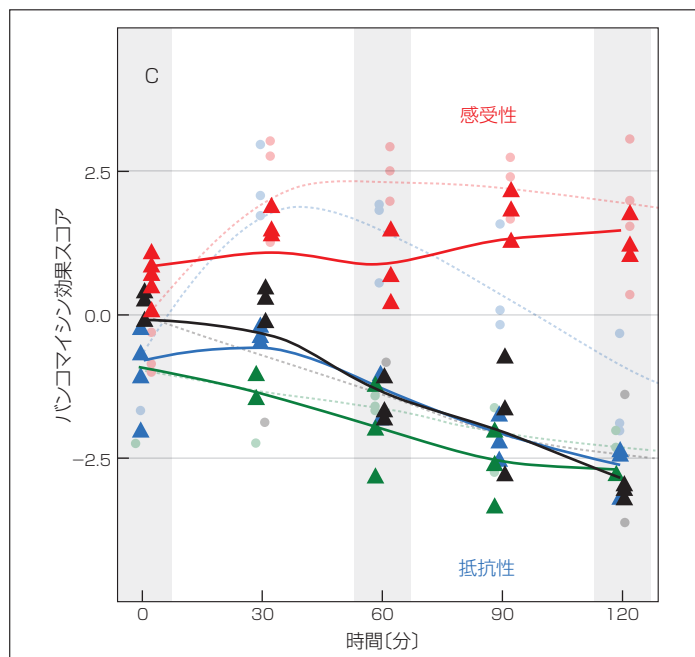


図1 VREを同定する分光法では、バンコマイシンを含む細菌懸濁液を処理し、0、30、60、90、120分後の試料を複合誘電泳動ラマン設定を用いて解析する。チップのマイクロメートルサイズのエリアで誘電泳動的に捕捉された細菌は、ラマン分光法によって解析される。統計モデルに投影されたスペクトルによって、病原体がバンコマイシンに対して感受性(正のバンコマイシン効果スコア)か、抵抗性(負のバンコマイシン効果スコア)か、判明する。(提供: U・C・シュレーダー氏ら<sup>(3)</sup>)

## 中赤外 3~12um

### チューナブル外部共振型 量子カスケードレーザー

Headhog

New!!



Side Kick

#### 特徴

- ・パルス、CW オペレーション
- ・広い波長チューニング領域
- ・1台のレーザーヘッドに最大4台のモジュール搭載 (MIRcat™ シリーズ)
- ・狭線幅
- ・モードホップフリー波長チューニング (CW-MHF シリーズ)
- ・ハイパワー 最大 2W (Aris™ シリーズ)
- ・高速チューニング >1000cm<sup>-1</sup>/sec (Hedgehog™ シリーズ)
- ・コンパクトなコントローラ (GUI & SDK 付き USB/Ethernet)

#### アプリケーション

- ・ナノスケール・イメージング & 赤外分光
- ・光音響分光 (PAS)
- ・ハイパースペクトル・イメージング
- ・時間分解赤外分光

<http://www.japanlaser.jp/>

E-mail: [lase@japanlaser.jp](mailto:lase@japanlaser.jp)

JLC 株式会社 日本レーザー

本社 〒169-0051 東京都新宿区西早稲田2-14-1

TEL: 03-5285-0853 (直)

大阪支店 TEL: 06-6323-7286

名古屋支店 TEL: 052-205-9711

カーで信頼できるものは現在ない。

70名の患者(それぞれの疾患のタイプが約半分ずつ)を対象にした研究では、CaF<sub>2</sub>スライド上で乾燥させた血しょう5μLの平均ラマンスペクトルの直接的な目視検査においては、敗血症と非感染性SIRSを区別できなかった。しかしながら、ラマンデータを多変量解析すると区別できた<sup>(2)</sup>。

診断におけるもう一つの課題は、腸球菌(腸内フローラ)のうち、バンコマイシン(細菌感染などを治療するときによく用いられる抗生物質)に感受性があるものと抵抗性があるものを区別することである。効果的な治療と感染の封じ込めには、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)を同定することが欠かせない。耐性菌は、細胞壁に存在するタンパク質の末端アミノ酸であるアラニンが乳酸塩(糖)に変化しており、この変化によってバンコマイシンが結合できない。近年の研究では、抗生物質の有無で分けた希薄懸濁液で、誘電泳動を行って細菌を捕捉し、2時間にわたって分析するためにラマン分光法が用いられた。研究者は、感受性と抵抗性の細菌の分子的反応における特性の違いを記録し、「バンコマイシンスコア」を算出する情報として1250、1500、2850cm<sup>-1</sup>におけるスペクトル差異を使用した<sup>(3)</sup>。時間を関数としてバンコマイシンスコアをプロットした研究では、2時間以内で耐性菌はスコアが低下し、一方で感受性菌はスコアが高いまま維持した(図1)。この方法は、あまりモデル開発されていない菌の状態同定にも利用できると研究者は言及する。

他の研究では、黄色ブドウ球菌に感染した細胞のスペクトルが計測された。慢性感染症では、これらの細菌は感染細胞に隔離されている。しかしながら、隔離された細菌が細胞外細菌と

異なるかどうかについては知られていなかった。実際には、細胞内細菌と細胞外細菌は多くの点において区別できる。これは、遺伝子発現における違いに由来すると思われる。これを応用して、感染した白血球と非感染白血球と明確に区別できることが示された。

#### 細胞選別の進展

驚くべき新たなツールであるラマン活性化細胞選別(RACS)によって、生物学者は細胞の表現型の変化を研究できるようになり、将来的には*in situ*で(その場で)可能になるだろう。ラベルフリーなアプローチは、蛍光ラベルが必要な従来法である蛍光活性化細胞選別(FACS)を補完する技術として役立つ。さらに個々の細胞の生化学的または代謝の性質に関する全体的な情報が加わるだろう<sup>(4)</sup>。RACSによる一細胞解析は、溶液中におけるラマンピンセットと、フローにおけるマイクロ流体工学または表面におけるラマン活性化細胞排出(RACE、図2)が統合することで実現しうるだろう<sup>(5)</sup>。誘導ラマン散乱やプレスクリーニングなどの進展によってRACS選別スピードが向上することが証明されている。さらに、パターン認識法によって一細胞ラマンスペクトルを評価することが容易になり、RACSにおいてバイオマーカーとなる特定のラマンバンドを抽出できるだろう。マイクロ流体工学やRACEに基づいた細胞選別の進展によって、複雑な試料における細胞選別の正確性や信頼性が向上することが示されている。

自然発生するラマンシグナルという固有の弱点によって、ハイスピードフローにおいて一細胞を同定するRACSの性能は制限されるが、代わりに停止選別のRACSのマイクロ流体システムが新たに研究されている。装置は、正

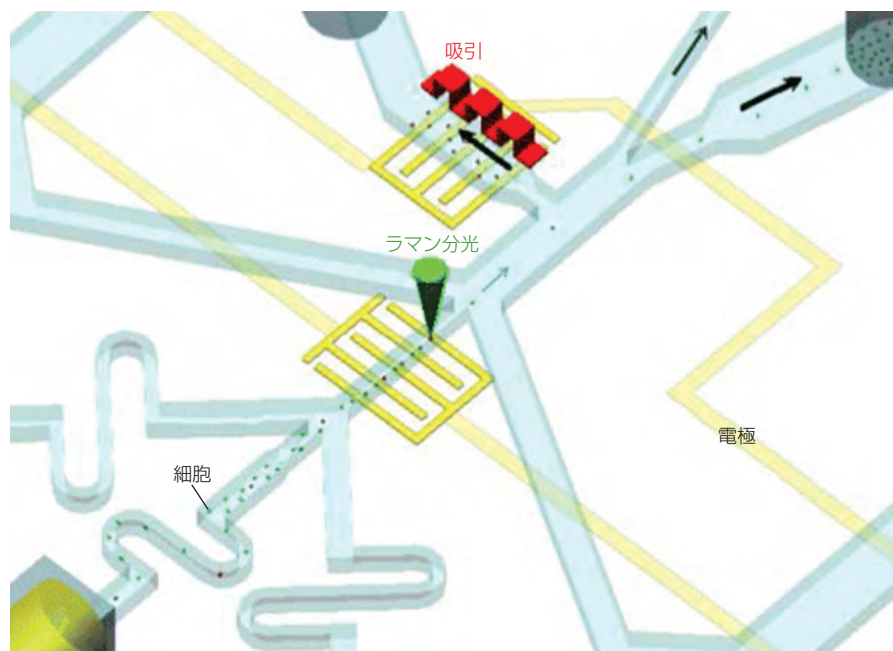


図2 ラマン活性化細胞選別 (RACS) を実現する3種類の技術のうちの1つがマイクロ流体力学である。他の2つはラマンピンセットRACSとラマン活性化細胞排出 (RACE) である。(提供: P・ツァン氏<sup>(6)</sup>)

の誘電泳動 (pDEP、一細胞の捕捉と放出のため) と、ソレノイド弁吸引をベースにしたスイッチ (細胞選別のため) を組み合わせることで、個々の細胞の捕捉、ラマン同定、自動選別を統合する。研究チームは、細胞を個々に捕捉、整理、配置するために周期的なpDEP場を機能させることで、サブ秒レベルでラマン測定を可能にした。このようなラマンベースの技術がハイスループットな選別技術と組み合わせることで、特定の表現型をもつ細胞を選別して、下流で一細胞を配列できるのは間近だ<sup>(6)</sup>。

多変量解析を組み合わせたラマン分光法の多用途性のもう一つの例は、治療薬の特性評価である。一細胞のラマン特性は毒物の存在下で大きく変化するため、製薬の初期段階でリアルタイムに薬剤の分布や細胞の反応をモニターしたり、細胞の様子を評価したりするためにラマン分光が用いられる<sup>(7)、(8)</sup>。

原子間力顕微鏡法と表面増強ラマン

散乱を組み合わせた先端増強ラマン散乱 (TERS) は、多くの細胞小器官の空間スケールに関する情報を得るのに有用であることが判明している。例えば、TERSを用いると、いくつかのタンパク質における天然とグリコシル化の状態の違いを見分けることができる<sup>(9)</sup>。現在は、一タンパク質のグリコシル化をフォローできるようなこの技術を発展させることに注目が高まっている。

最後に、抗体開発に取り組む科学者

は、溶液中におけるタンパク質の安定性をモニターするための高感度ツールとしてラマン分光法を見ている。タンパク質凝集を明らかにするために、ラマン分光法と二次元の摂動相関移動窓 (PCMW) 顕微鏡を組み合わせたものは、抗体工学では欠かせない<sup>(10)</sup>。研究者はタンパク質試料を56~78℃に加熱し、ラマンスペクトルを取得するために532nmの励起波長を用いて、5種類の抗体を凝集傾向の変化で比較した。「最初の主成分分析によって、5種類全ての試料に対して、観察されたスペクトル変化と温度上昇の動向が確かめられた」と研究者は報告した。「スペクトル変化が温度と直接関連すれば、タンパク質の安定性に関連して試料間の構造変化の明確な違いが決定できることが、PCMWを用いる解析によって明らかになった」として、凝集のメカニズムをより深く理解できるとした。

ラマン分光法に基づいたシステムや最新の解析ソフトウェアの大きな発展によって、生物学のツールボックスは拡大している。細胞や組織などの複雑な試料を解析するため、ラマン分光法の優れた可能性を多くの科学者が実感すれば、生態医療分野において大きな発見と進展がより早い速度で起きるだろうとわれわれは期待する。

#### 参考文献

- (1) K. Majzner, *Anal. Chem.*, 86, 13, 6666–6674 (2014).
- (2) U. Neugebauer, *J. Biophoton.*, 7, 3–4, 232–240 (2014).
- (3) U. C. Schröder et al., *Sci. Rep.*, 5, 8217 (2015).
- (4) J. Perkel, *The Scientist*, 6, 59 (2015).
- (5) Y. Song, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 33, 1–8 (2016).
- (6) P. Zhang, *Anal. Chem.*, 87, 2282–2289 (2015).
- (7) R. Smith et al., *Analyst*, 141, 3590 (2016).
- (8) A. Zoladek et al., *J. Raman Spectrosc.*, 42, 251–258 (2011).
- (9) D. Cowcher et al., *Anal. Chem.*, 88, 2105–2112 (2016).
- (10) R. De La Cuesta, *Anal. Chem.*, 86, 11133–11140 (2014).

#### 著者紹介

マリネッタ・G・サンドロスは米ホリバ・サイエンティフィック社 (Horiba Scientific) の生命科学向け事業開発マネージャーおよびSPRI製品マネージャー、フラン・アダルは同社の世界的ラマンアプリケーションマネージャー。e-mail: marinella.sandros@horiba.com URL: www.horiba.com