



島根大学学術情報リポジトリ
S W A N
Shimane University Web Archives of kNowledge

Title

ラマン分光法及び近赤外分光法による生体の *in situ* イメージング分析 — 分子分光分析を通して生命の輝きを視る —

Author(s)

Kohei Nishino, Misaki Kushima, Tomohiro Kaino, Yasuhiro Matsuo, Makoto Kawamukai

Journal

分析化学 2022 年 71 巻 4.5 号 p. 221-233

Published

2022/04/05

URL

<https://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.71.221>

この論文は出版社版ではありません。
引用の際には出版社版をご確認のうえご利用ください。

総合論文

ラマン分光法, 近赤外分光法を用いた生体の *in situ* イメージング分析 — 分子分光分析を通して生命の輝きを見る —

石垣美歌^{1,2}

ラマン分光法は、分子構造を鋭敏に反映したスペクトル情報を非破壊的に取得でき、近赤外分光法は生体分子組成や分子濃度、タンパク質などの生体分子と水分子との相互作用を同時に分析することができる。筆者は両分光法を相補的に用いることで、生体分子の構造と機能、水との相互作用の関係性について独自の研究テーマを展開してきた。近年では特に、命があること、命が宿るとは一体どういうことか、この大きな謎に迫りたいと思い、卵細胞の代謝活性と水の水素結合ネットワークとの関係性、及び卵質評価について研究している。さらに、胚発生の非染色イメージングの研究や、カロテノイド会合体形成メカニズムの研究、さらには近赤外イメージング装置の共同開発を手掛けるなど、分析化学、物理化学から生物物理化学にまたがる境界領域において研究を推進してきた。本稿では、筆者が近年実施してきた研究成果の中から、「近赤外分光法, 近赤外イメージングを用いたメダカ胚発生の非染色イメージング」、「ラマン分光法を用いたマウス卵子成熟度、及び初期胚発生の分析」、「共鳴ラマン分光法, イメージングを用いたリコピン会合体の研究」の3つの研究内容に絞って紹介する。

1 緒言

ラマン分光や近赤外分光法は振動分光法の1種であり、分子振動モードに対応した光振動数のシフトや光吸収強度を分析することで、対象内の分子組成、分子構造情報を非破壊的に分析することができる¹⁾³⁾。特にラマン分光法は、生細胞や生組織の *in vivo*, *in situ* 分析により適しており、生体応用、医療応用への期待が高まっている。筆者も消化器用レーザーラマン分光診断・治療支援システムの開発に携わった経験があり、大腸癌モデルマウスやヒト初期食道癌、口腔癌を対象とした生体分子分光分析の研究も展開してきた⁴⁾⁶⁾。初期食道癌の研究では、ラマンスペクトルデータに多変量解析を適用することによって、膨大な生体ラマンデータの中から癌に特徴的な分子組成情報を洗い出し、高い精度でステージ0やIの初期食道癌を判別することに成功した⁵⁾。また、ラマン分光法は分子構造を鋭敏に反映したスペクトル情報を取得できるため、本稿で紹介するタンパク質の構造変化やカロテノイド会合体の分析にその威力を発揮する。しかし、水由来のラマンバンドについては、1650 cm^{-1} 付近に検出される O-H 変角振動由来のバンド強度が弱く、タンパク質のアミド I のバンドに隠れてしまう。また、O-H 対称伸縮

振動 ($\sim 3250 \text{ cm}^{-1}$) や逆対称伸縮振動 ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$) が検出される波数領域では、タンパク質の N-H 伸縮振動のバンドと重なるため、生体内の水を *in situ* で分析することに困難が伴う。

近赤外分光法では、分子の基準振動の倍音、結合音が検出されるため、近赤外光の透過性は可視光や赤外領域と比較して圧倒的に優れている。特に、近赤外領域では水の吸収強度が弱いことから、厚さミリメートルオーダーの水溶性サンプルを非破壊的にあるがままの状態で分析することができる。中赤外領域では、マイクロメートルオーダーにサンプルを調整する必要があることと比較すると、本特徴は近赤外分光法の非常に大きな利点であることは明白である。さらに、5200 cm^{-1} 付近に検出される水 OH 基の逆対称伸縮振動と変角振動の結合音のバンドに着目すると、近傍波数領域 4800 cm^{-1} や 4600 cm^{-1} にタンパク質由来のアミド A とアミド II, アミド A とアミド III の結合音のバンドがそれぞれ検出されるため⁷⁾、水とタンパク質とを独立して分析することができる。そのため、近赤外分光法は生体の水とタンパク質を *in situ* で分析するための非常に有用な手法であると言える。そこで、分子構造を鋭敏に反映したスペクトル情報を取得できるラマン分光法と、生体の水とタンパク質を *in situ* で分析できる近赤外分光法とを相補的に用いることにより、生体分子構造と生体機能、水との相互作用の関係性について研究するスタイルを、筆者の研究の特徴と位置付けている。

* E-mail : ishigaki@life.shimane-u.ac.jp

¹ 島根大学 学術研究院農生命科学系 : 690-8504 島根県松江市西川津町 1060

² 島根大学 戦略的研究推進センター : 690-8504 島根県松江市西川津町 1060

本稿では、筆者が近年実施してきた研究成果の中から、以下の3つの研究内容を紹介する。まず、「近赤外分光法、近赤外イメージングを用いたメダカ胚発生の非染色イメージング」の研究では、胚発生過程にあるメダカ胚を分析し、正常に胚発生を示す胚で起こっている遺伝子発現や、それに伴うタンパク質合成などの非常に複雑な生化学的変化を、水の水素結合ネットワークの変化から捉えた⁸⁾。また、メダカ胚内の血流イメージングと、脂質やタンパク質などの生体分子分布を非染色かつ同時にイメージングすることにも成功した。生体の主成分は水であり、その存在比率はタンパク質や脂質などの成分に比べて圧倒的に多く、生体の生化学的反応は水を媒体として起こることから、その影響は水に転写されるはずである。このような観点から、水を通して生体機能や代謝活性を評価し、「水を通して生体を視る」という新たな研究領域を展開してきた。

次に、「ラマン分光法を用いたマウス卵子成熟度、及び初期胚発生の分析」では、受精可能性や生存可能性を決定するバイオマーカーを、卵子（受精卵）を生かしたまま探ることを目指してきた⁹⁾¹⁰⁾。脂質やリン酸などの成分を、卵質を決定するバイオマーカーとして同定でき、レーザー照射後の体外受精により、卵子への非侵襲性を確認することができた。命があるということ、命が宿るとは一体どういうことか、この大きな謎に分子分光の立場から迫りたいと考えている。

最後に、「共鳴ラマン分光法、イメージングを用いたリコピン会合体の研究」では、リコピン会合体形成によるエキシトシン効果を、リコピン分子がサイトシフト効果のように感じ、見かけ上の共役2重結合差長の長さが増加したとする物理化学的見解から、リコピン分子の特性を捉えたことに成功した¹¹⁾。そして、H会合体、J会合体を形成するリコピン分子が層状にトマト内に分布する様子をイメージングにより捉えることができた。以下、それぞれの研究内容の詳細を記載する。

2 近赤外分光法、近赤外イメージングを用いたメダカ胚発生の非染色イメージング

近年、近赤外分光法、近赤外イメージングを用いたメダカ胚発生の非破壊、非染色モニタリングの研究を実施してきた⁸⁾¹²⁾¹⁶⁾。その中でも本研究は、胚発生が活性化した胚を水の水素結合ネットワークの違いから捉えることを目指した⁸⁾。正常発生を示すメダカ胚と、未受精卵や低温培養等によって発生が不活性化したメダカ胚の水分子の水素結合ネットワークの違いについて分析し、水分

子と他の生体分子との相互作用の違いからメダカ胚発生の活性化を評価した。

また、結像型2次元フーリエ分光システムを用いたメダカ胚の発生モニタリング分析において、メダカ胚の非染色血流イメージングに成功した¹²⁾。血流や心拍などの動的対象から反射された光は、ドップラー効果によって微小な振動数のズレが生じる¹⁷⁾¹⁸⁾。そこで本システムにより、その微小な振動数のズレを光干渉によって検出し、心拍由来のシグナルを抽出した。そして、脂質、タンパク質などの生体分子分布と、血流の同時非染色イメージングを可能とした。

2.1 実験

本研究では緋メダカの胚を使用した。まず、胚発生の活性化による水の水素結合ネットワークの違いを分析するため、胚発生が活性化した胚(a)、及び3種類の非活性化胚(b)-(d)を使用した。

- 受精1日目の正常発生を示す胚
- 受精1日目の受精卵の培養温度を3°Cに設定し、発生を停止させた胚
- 液体窒素により凍結させ、発生を停止させた胚
- 未受精卵

近赤外測定には Spectrum Spotlight FT-IR Imaging System (Perkin Elmer) を用い、室温25°Cで近赤外イメージングデータを取得した。波数7800-4000 cm⁻¹、波数分解能4 cm⁻¹、空間分解能25×25 μm²、積算回数60回で測定した。イメージングデータ測定には、15分程度要した。メダカ卵は直径およそ1.5 mmの球形であり、光路長を揃えるため、スパーサー0.36 mmを挿入してメダカ胚を2枚のスライドガラスに挟み、ピンチコックで固定した。

次に、血流イメージングの実験では、結像型2次元フーリエ分光システム(NT00-T011-01, NT00-T012, アオイ電子社製)を用い、受精5日目のメダカ胚の近赤外イメージングデータを取得した。空間分解能は約8 μm、波長1000-2500 nm、波長分解能は約10 nmであり、局所可動ミラーは250 μm動き、30秒の測定時間で1800枚の画像を取得した。

2.2 結果・考察

2.2.1 メダカ胚発生の活性化を水の水素結合ネットワークの違いから視る

メダカ胚の卵黄部分から取得した近赤外吸収スペクトルの平均をFig.1Aに示す。7000 cm⁻¹及び5200 cm⁻¹付近にO-H対称伸縮振動と逆対称伸縮振動の結合音、O-H逆対称伸縮振動と変角振動の結合音のバンドが、それぞれ検出された¹⁹⁾。5000-4200 cm⁻¹の2次微分スペクトルで

は、4410, 4338, 4258 cm^{-1} に脂質由来の C-H 振動と変角振動の結合音が²⁰⁾²¹⁾, 4864, 4538 cm^{-1} に N-H 伸縮振動とアミド II の結合音 (β シート, α ヘリックス), 4612 cm^{-1} に N-H 伸縮振動とアミド III の結合音によるピークが観測された (Fig.1B)²²⁾²³⁾. このように、近赤外スペクトルでは水、タンパク質、脂質を同時に独立して分析することができる。

上記 6 つのバンドの 2 次微分強度を比較すると、(a)、(b) におけるタンパク質や脂質由来のピーク強度が(c)、(d) に比べて弱くなっていることが分かる。卵黄には、胚発生や孵化後に初めて捕食するまでの間に必要なエネルギーが、タンパク質や脂質として蓄えられている。そのため、(a)、(b) でこれらの 2 次微分強度が下がっていることは、胚発生によって代謝されたことによる成分濃度の減少を検出していると考えられる。

5500-5000 cm^{-1} の水の 2 次微分スペクトルデータセットに対して主成分分析 (PCA) を実施したところ、主成分 2 (PC2) において発生が活性化した胚(a)と、非活性の胚(b)-(d) の間で、水の吸収バンドに違いがあることが示された (Fig.1C). PC1 には水の 2 次微分スペクトルが現れており、PC2 は PC1 に対する補正項として下向きに 5336, 5200 cm^{-1} のピークが、上向きに 5276 cm^{-1} のピークが確認できる (Fig.1D). 胚発生が活性化した胚では PC2 のスコアは平均してマイナスの値を持つことから、PC1 のローディングスペクトルに対して 5276 cm^{-1} 付近の 2 次微分強度を下向きに増強させ、5336, 5200 cm^{-1} を押し上げて、全体的にピーク位置が高波数側にシフトすると解釈できる。

水の近赤外吸収バンドは、温度上昇と共に高波数シフトする (Fig.2A). 2 次微分スペクトルを計算すると下向きに 2 つのピークが現れ、温度変化と共にこれらの 2 次微分強度比が変化する (Fig.2B). 近赤外分光法による水分析において、Fig.2B の領域では主に 2 つ水成分で説明できることが先行研究によって報告されており、水分子の酸素原子において、非共有電子対が周りの分子と 2 つとも水素結合をするものを強い水素結合をする水 (SHB : $\sim 5170 \text{ cm}^{-1}$), それ以外のものを弱い水素結合をする水 (WHB : $\sim 5250 \text{ cm}^{-1}$) として定義されている²⁴⁾²⁷⁾. つまり、温度上昇に伴う水吸収バンドの変化は、主にこの 2 成分の水の存在比率が変化することに起因すると解釈できる。PCA によって示された胚発生の活性化の違いによる水吸収バンドの違いは、これら 2 つの水成分の比率の違いとして理解できる。実際に水吸収バンドの 2 次微分強度比 (I_{5250}/I_{5170}) を計算すると、胚発生が活性化した胚では WHB の割合が高いことが示唆された (Fig.2C).

2 成分 (WHB, SHB) の水の割合に影響を与える因子として、温度変化、イオン濃度変化、タンパク質濃度変化、タンパク質 2 次構造変化を摂動として与え、メダカ胚発生に伴う水の変化と同等の影響を与え得る因子について調べた⁸⁾. その結果、タンパク質の 2 次構造が α ヘリックスから β シートリッチな構造へと変化した際に、2 成分の水の割合が大きく変化することが示された。実際に、胚発生が活性化した胚では、タンパク質の 2 次構造が β シートリッチに変化していることがラマン分光法により確認され、その影響が水に転写された可能性が示された。水吸収バンドの 2 次微分強度比 (I_{5170}/I_{5250}) を 2 次元にプロットして、異なる水素結合ネットワークを持つ水の分布を可視化した (Fig.2D). (I) は 4 種類のメダカ胚の可視画像であり、(a)では油滴、卵黄、胚盤 (将来メダカになる部位) の 3 つの構造が見られる。(b)も(a)と同様の構造が見られ、両者は一見区別がつかない。(c)では胚盤の構造が見えなくなっており、未受精卵では油滴が卵内全体に分布している様子が確認できる。(II) の近赤外イメージングでは、赤色の部分が SHB の水の割合が高くなっていることを示している。胚発生が活性化した (a)では、他の胚と比べて卵黄部分全体が青みがかっており、WHB の割合が高いことがイメージングでも確認できた。胚発生が活性化した胚の水の水素結合ネットワークの違いを捉えた大変興味深い結果となり、*Analytical Chemistry* の表紙に選出された⁸⁾.

2.2.2 ドップラー効果による光干渉を応用したメダカ胚非染色血流イメージング

結像型 2 次元フーリエ分光システムを用いて、メダカ受精卵から取得した近赤外スペクトルを分析した。本分光システムは、共同研究者である石丸教授とアオイ電子(株)によって共同開発されたものである。本システムには位相シフターとして局所可動ミラーが設置されており、試料観察面内から生じる物体光に位相差を与える (Fig.3A)²⁸⁾. そして、位相差を与えられた光は干渉によりインターフェログラムを形成し、フーリエ変換によって 2 次元分光情報を取得することができる。焦点面以外からの光干渉は直流成分として検出されるため、インターフェログラムに現れる交流成分を分析することにより、原理的に共焦点近赤外イメージングデータを取得することができる。

Fig.3B は、受精 5 日目のメダカ受精卵可視画像の拡大図である。目や油滴、胚体の詳細な構造が観察できる。Fig.3C は、Fig.3B の卵黄部分(A)から反射モードで取得されたインターフェログラムである。 x 軸は局所可動ミラーの移動距離を表しており、中心値 125 μm でセンターバ

ーストが観測される．一方，Fig.3Bの心臓部分(B)から取得したインターフェログラムには，ノイズのような周期的微小波形が乗っていることが分かる (Fig.3D)．このノイズ波形を拡大すると，5秒間で16回の波形が観測された．これは3.2Hzの波形に対応しており，目視によるメダカ胚の心拍数と一致した．つまり，このノイズ波形は心拍や血流の周期的な動きに関連していることが分かる．そこで，インターフェログラムをフーリエ変換した後のノイズ成分波長 (λ μm) を計算した．30秒間に生じる光路差は $250\sqrt{2}$ μm であり，その間に $3.2 \text{ Hz} \times 30$ 個の周期的波形が存在するため， λ は式(1)から3.68 μm と求められた．

$$\lambda = \frac{250\sqrt{2}}{3.2 \times 30} \quad (1)$$

実際，フーリエ変換後のデータにおいて，3768 nmに鋭いピークを検出し (Fig.4A)，その第1倍音，第2倍音に対応する1884, 1256 nmにもピークが検出された (Fig.4B)．

心拍に特徴的なシグナルは，周波数がわずかに異なる2つの波が重ね合わされた際に生じる干渉 (ヘテロダイン干渉) により検出されたと考えられる^{17) 18)}．本現象を引き起こすメカニズムを理解するため，簡単のために単色光源から放出される光の干渉を考える．Fig.3(A)において，サンプルの点 O で反射された光は結像レンズを通過し，位相シフターで反射され，再び結像させ CCD カメラで検出する．2つの光信号による観測点 r での複素振幅は，式(2)のように表すことができる．

$$E = A_1 e^{-i\varphi_1(r)} e^{i\omega t} + A_2 e^{-i\varphi_2(r)} e^{i\omega t} \quad (2)$$

ここで， A_1 ， A_2 は振幅を， ω は角振動数， $\varphi_1(r)$ ， $\varphi_2(r)$ は観測点 r における位相を表しており，光路長 l_i ，波長 λ を用いて $\varphi_i(r) = 2\pi l_i / \lambda$ と表される．本システムでは，位相シフターにより $\varphi_1(r)$ ， $\varphi_2(r)$ は異なる位相を持つ．観測される光強度は振幅の2乗であるため，以下のように求められる．

$$I = |E|^2 = A_1^2 + A_2^2 + 2A_1 A_2 \cos \Psi(r) \quad (3)$$

$$\Psi(r) \equiv \varphi_1(r) - \varphi_2(r) = \frac{2\pi}{\lambda} \delta \quad (4)$$

$$\delta = l_1 - l_2 \quad (5)$$

一方，血流などの動的物体によって反射される光は，ドップラー効果によって光振動数が変化するため (角振動数 ω')，観測点 r での複素振幅は，次のように表すことができる．

$$E' = A_1 e^{-i\varphi_1(r)} e^{i\omega t} + A_2 e^{-i\varphi_2(r)} e^{i\omega' t} \quad (6)$$

そのため，観測点 r における光強度は次のように求められる．式(3)と比べると内積項の位相が異なる．

$$I' = |E'|^2 = A_1^2 + A_2^2 + 2A_1 A_2 \cos \Psi'(r, t) \quad (7)$$

$$\Psi'(r, t) \equiv \varphi_1(r) - \varphi_2(r) - (\omega - \omega')t = \frac{2\pi}{\lambda} \delta - \delta_\omega t \quad (8)$$

$$\delta_\omega = \omega - \omega' \quad (9)$$

このように，ドップラー効果による振動数のズレが，光の干渉を用いて検出されることが確認できる．

透過モードでも近赤外イメージングデータを取得した．吸収スペクトルには，心拍由来のバンドが1880, 2260 nm付近に負の方向に確認された．心拍数は個体差や発生の段階によって多少ばらつきが見受けられた．また，1940 nmには水のOH基由来のバンドが，2360 nm付近には脂肪族化合物や炭化水素などのCH基由来の吸収ピークが検出された¹⁹⁾．そこで，(a) 2260 nmの光強度，(b) 1880 nm，(c) 1940 nm，(d) 2360 nmの吸光度を2次元にプロットすると，Fig.5のような近赤外イメージングが得られた．心臓部位や血管の構造，胚体や卵黄の分布を，同時かつ非染色にイメージングすることに成功した．

3 ラマン分光法を用いたマウス卵子成熟度，及び初期胚発生の分析

受精卵は生命の起源である．しかし全てが発生可能なわけではなく，その生存可能性は「受精卵の質」，あるいは「卵子の質」に依ると言われている．そして，生殖補助医療において“卵子の健全性 (卵質)”が極めて重要な鍵となるため，更なる生殖補助医療の精度向上のために新たな細胞評価技術の必要性が高まっている．

一般的に，卵質による分子組成の違いや初期胚発身に伴う卵内物質の生化学的変化は，①RNA，タンパク質，脂質などの成分を，RNA アッセイや電気泳動法，ガスクロマトグラフィーなどの破壊分析によって詳細に調べられる^{29) 31)}．また実際の生殖補助医療の現場において，卵質は②顕微鏡下における卵子の色や形などの形態学的観察により評価される．さらに③培養液の分析から，卵子の代謝活性を間接的に評価する試みもなされている^{32) 33)}．

しかし上記①のように生体内物質を網羅的に解析する手法では，組織を破壊して成分を抽出する必要があるため，細胞にダメージを与えずに卵質を評価することができない．さらに，②の手法では観察者の主観に基づくところが大きく，②③では卵質を決定付ける分子情報が得られないという問題点がある．そこで，ラマン分光法を卵質評価に応用することで上記①-③の問題点を解決し，非破壊かつ非染色に生きた卵子から取得した分子情報を基に，卵質を評価する新たな手法の開発を手掛けてきた^{9) 10) 34)}．

ここでは，2つの卵質評価についての研究成果を紹介する．1つ目は，マウス卵子の成熟度を評価し，受精・発生能力の高い卵子を非破壊，非侵襲的に判別できるか検証した⁹⁾．2つ目は，マウス初期胚の発身に伴う卵内物質の変化や，卵質による生化学的違いについて分析を行った研究である¹⁰⁾．以下，それぞれの研究について紹介する．

3・1 実験

卵子成熟度判別の実験において、マウス卵子は hCG (ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン) 投与による排卵誘起後 4 段階の経過時間 (13h (I), 15h (II), 18h (III), 24h (IV)) で採卵し、卵子 (直径約 80 μm) の中心部を 1-3 点測定した。hCG 投与後 15 時間の卵子が最も受精能、発生能が高く、過熱になるにつれて卵質が下がることが報告されている (Fig.6)³⁵⁾。マウス初期胚の分析では、マウス初期胚 (未受精卵・前核期・2 細胞期・4 細胞期・8 細胞期) からラマンスペクトルを取得した。785 nm レーザー、グレーティング 600 line/mm, サンプルポイントでのレーザーパワー 50 mW, 30 秒 (15 秒 \times 2) の露光時間で測定した。取得したラマンスペクトルは、5 次関数の多項式近似によりバックグラウンドを除去し、1004 cm^{-1} 付近のフェニアラニンのピークの高さが 1 になるよう規格化した。

3・2 結果・考察

3・2・1 マウス卵子成熟度判別のバイオマーカーを探る

Fig.7 は、成熟度の異なる 4 段階の卵子から取得した平均ラマンスペクトルである。Table 1 に示すように、タンパク質、脂質、DNA/RNA 由来の明確なバンドが多数観測された³⁶⁾。

全ラマンスペクトルデータセットに対して PCA を実施し、卵子成熟に伴う卵内物質の変化について分析した。その結果、PC1 で 24h とそれ以外の時間帯の卵子が分けられており、PC4 で 13h, 15h と 18h, 24h に分かれた (Fig.8A)。PC1 のローディングには脂質由来のスペクトルパターンが現れており、PC4 ではリン酸由来のシグナルが 1046 cm^{-1} に鋭く検出された (Fig.8B)。この結果は、24h の過熟胚で脂質濃度が相対的に高く、受精・発生能力の高い卵子 (13h, 15h) ではリン酸濃度が高くなっていることを示している。脂質はマウス卵子成熟のためのエネルギー源であるため^{37) 38)}、脂質濃度上昇は、エネルギー源が正しく代謝されていないことを示し、過熱に伴う代謝異常を示唆していると考えられる。また、卵成熟促進因子 (MPF) はヒストンキナーゼ p34 (cdc2) と cyclin B から成るタンパク質複合体であり、cdc2 のリン酸化により MPF 活性が制御されている^{39) 40)}。MPF が活性化されると、他のタンパク質をリン酸化して、卵子成熟のシグナルがカスケード状に伝達される。細胞の活性が高いほど、ミトコンドリアによってより多くの ATP が生成され、リン酸濃度が高いほど MPF 活性を保持し、卵子成熟のシグナル伝達が十分行うことができる状況になっていると考えられる。

この PC4 の成分を用いて線形判別分析 (LDA) を行った。4 段階の全 324 スペクトルデータを半分に分け、一方で PCA-LDA モデルを作成し、残りのデータを未知サンプルとして当てはめ、受精・発生能力の高い卵子 (13h, 15h) と過熟卵子 (18h, 24h) とが正しく判別されるか検証した。その結果、90.7%の精度で 13h, 15h の受精・発生能力の高い卵子を判別できることが示された。

さらに、レーザー照射後の卵子に体外受精を施して 5 日間培養したところ、50%以上の高い確率で桑実胚や胚盤胞まで卵割が進むことが確認され、レーザー照射による影響がほとんど検出されないことが分かった (Fig.9)。本研究により、ラマン分光法を用いた非破壊、非侵襲的な卵質評価の可能性が示され、*Analyst* の表紙に選出された⁹⁾。

以上の結果より、hCG 投与後の時間経過に伴う卵子成熟度を、脂質やリン酸などのラマンバンドを用いてモニタリングできる可能性が示された。また、レーザー照射による影響も特に検出されなかったことから、ラマン分光法を用いての非破壊、非侵襲的な卵質評価実用化へ向けた重要な結果が得られた。

3・2・2 マウス胚初期発生の分析による卵質評価

本研究では、マウス初期胚の発生に伴う卵内物質の変化や、卵質による生化学的違いについて分析を行った。マウス初期胚 (未受精卵・前核期・2 細胞期・4 細胞期・8 細胞期) から取得したラマンデータセットに対して PCA を行ったところ、Fig.10A に示すように PC1 のスコアは卵割が進むにつれてプラス \rightarrow マイナス \rightarrow プラスと系統的に変化した。そして、PC1 のローディングには脂質由来のスペクトルパターンが現れている (Fig.10B)。全てのラマンスペクトルは、1004 cm^{-1} のフェニアラニンのバンドの高さが 1 になるように規格化しているため、この結果は受精後一時的にタンパク質の濃度が上昇し、脂質などの他の生体分子濃度が相対的に減少したように見えたと考えられる。また PC2 では、未受精卵と受精卵とが 2 つのグループに分けられており、その両者を分ける成分としてタンパク質の 2 次構造に由来するバンド (α ヘリックス: 939 cm^{-1} , β シート: 980 cm^{-1}) が検出された (Fig.10B)³⁶⁾。つまり、受精によってタンパク質の 2 次構造に変化があることが示唆され、発生に伴って β シート構造が減少し、 α ヘリックス構造の割合が増加する様子が確認された (Fig.10C)。しかも、2 細胞期と 4 細胞期の間でタンパク質の 2 次構造割合が大きく変化しており、他の先行研究において、本時期に卵内物質が母性由来から胚由来へと移行するという報告と一致している^{41) 42)}。さらに、タンパク質の 2 次構造変化と連動するように、チロシンダ

ブレットの強度比 ($855/830 \text{ cm}^{-1}$) が変化する現象も検出された (Fig.10D). このバンド強度比はチロシン残基の OH 基の環境の違いを検出しており⁴³⁾, タンパク質の 2 次構造変化とチロシンダブルレットの強度比の変化が連動して検出されたことは、非常に興味深い結果である。

最後に、割球の形や色、細胞断片などの形態学的特徴から良質胚、不良胚と判断されるデータセット (Fig.11) に対して、再び PCA を行った。その結果、各卵割段階の不良胚では、共通して脂質とヒドロキシアパタイトの相対濃度が高くなっていることが示唆された。これらのラマンバンドは、卵質を評価する際のマーカーバンドとなる可能性を示しており、分化発生過程におけるタンパク質の 2 次構造変化や卵質に関するバイオマーカーの同定という、発生学において興味深い知見を得ることができた。

4 共鳴ラマン分光法, イメージングを用いたリコピン会合体の研究

本研究では、機能性トマト内のリコピン成分を、ラマン分光法を用いて非破壊かつ簡易的に分析し、品質を担保する手法を開発するための基礎研究を行った。紫外・可視 (UV-VIS) 分光法とラマン分光法を用いて、リコピン会合体の $S_0 \rightarrow S_2$ 電子遷移及び基底状態における分子振動を *in vitro* 及び *in vivo* で詳細に分析し、トマト内におけるリコピンの構造や分布を、ラマンイメージングによって可視化することを目指した¹¹⁾。

4.1 実験

リコピン凝集体の *in vitro* 測定では、リコピンを濃度の異なるアセトン水溶液に溶かし (100%, 80%, 50% and 20% acetone/water (v/v)), 氷で冷却しながら 7-10 分間超音波破砕機にかけた。100%アセトン溶液ではリコピンは単量体として存在し、アセトン水溶液では J 会合体, H 会合体が共存する。紫外・可視及びラマン測定においては、石英キュベットに 5 mL のリコピン溶液を注入して測定した。また石英ガラスに 1-2 mL リコピン溶液を滴下することにより、溶液の蒸発によって乾燥したリコピン凝集体 (マイクロ結晶) が得られた (Fig. 12A)。トマトの *in vitro* 測定では、外果皮, 中果皮, 内果皮, 胎座から各スペクトルを取得した。トマトサンプルはタキイ種苗株式会社から提供を受けた。

可視・紫外分光法による測定は UV-3600 (SHIMADZU, Japan) を使用し、波長領域 300–800 nm の反射測定を行った。ラマン測定では 638 nm (DL 638-025-S, CrystaLaser, USA), 532 nm (RL532C150, Renishaw Inc., UK) の 2 波長レーザーを使用し、グレーティング 1800 line/mm を用い

た。イメージング測定では共焦点顕微ラマンシステム (*inVia Qontor*, Renishaw Inc., UK) を用い、空間分解能 1 μm で測定した。

4.2 結果・考察

リコピンのアセトン水溶液の紫外・可視吸収スペクトルを Fig.12B に示す。100%アセトン溶液では、共役 π 電子系の $1^1A_g(S_0) \rightarrow 1^1B_u(S_2)$ 遷移に対応する吸収バンドが 448, 473, 505 nm に観測された⁴⁴⁾。また、アセトン水溶液、マイクロ結晶では 358 nm 及び 556 nm 付近に H 会合体, J 会合体由来の吸収バンドが検出された。トマト組織の紫外・可視吸収スペクトルにおいても 350 nm, 及び 556 nm 付近に吸収バンドが確認され、トマト内のリコピン分子も H 会合体, J 会合体を形成して存在していることが確認された¹¹⁾⁴⁵⁾。

532 nm 励起により共鳴ラマンスペクトルを取得したところ、1514, 1156 cm^{-1} に C=C 伸縮振動 (ν_1) 及び C-C 伸縮振動 (ν_2) 由来のバンドが観測された (Fig.12C)⁴⁶⁾⁴⁷⁾。 ν_1 バンドの 2 次微分スペクトルから H 会合体 (1521 cm^{-1}), J 会合体 (1508 cm^{-1}) 由来のバンドは単量体 (1511 cm^{-1}) のバンドからそれぞれ高波数, 低波数にシフトしていることが分かる (Fig.12D)。そして、Fig.12E に示すトマトの外果皮及び胎座から取得したラマンスペクトルから、*in vivo* における H 会合体及び J 会合体のラマンバンドは 1516 cm^{-1} , 1506 cm^{-1} に観測されることが分かった。アセトン水溶液、マイクロ結晶、トマト組織内における H 会合体, J 会合体, 単量体の $S_0 \rightarrow S_2$ 遷移エネルギー、及びラマンシフト ν_1 をそれぞれ 2 次元にプロットすると、アセトン水溶液 (100%, 80%, 50% and 20% acetone/water (v/v)) のデータセットに対して、Fig.12F のように線型性が確認できた。

共鳴ラマン分光法は、電子基底状態での分子振動に関する情報を与えるため、 ν_1 バンドは基底状態でのリコピン分子の振動特性を表す。 ν_1 バンドの振動数は共役 2 重結合鎖長の逆数に比例することが報告されており、 $S_0 \rightarrow S_2$ 電子遷移エネルギーも共役 2 重結合鎖長の逆数に比例することが先行研究により多数報告されていることから、 $S_0 \rightarrow S_2$ と ν_1 の間に線型性が成り立つことが分かる⁴⁸⁾⁴⁹⁾。また、溶媒の分極率によって変化する $S_0 \rightarrow S_2$ と ν_1 との間にも線型性があり、溶媒によるサイトシフト効果が電子基底状態に影響を与え、見かけ上の共役 2 重結合鎖長が変化したと考察されている⁴⁷⁾。本研究結果で得られた $S_0 \rightarrow S_2$ と ν_1 との間の線型性についても同様に、H 会合体及び J 会合体形成におけるエキシトン効果を、リコピン分子が一種のサイトシフト効果のように感じ、見かけ上の共役 2 重結合鎖長が変化したものと解釈した。

最後に、主成分分析 (PCA) を用いてトマト断面のラマンイメージングを行った (Fig.13). 主成分 1 (PC1) のローディングプロットには 1516, 1157 cm^{-1} に H 会合体に特徴的なバンドが現れている. 一方, PC3 のローディングプロットでは, PC1 に比べて ν_1 , ν_2 のバンドがそれぞれ低波数, 高波数にシフトしていることから, PC3 は J 会合体に特徴的なスペクトル成分を表していることが分かる. また, PC4 は果皮表面のワックス成分を表している. それぞれの主成分スコアを 2 次元にプロットしたところ, H 会合体, J 会合体, 及び果皮や種子表面のワックス成分の *in vivo* での分布を可視化することに成功した. 異なる構造のリコピン会合体が果皮付近で層状に分布する様子が鮮明に捉えられたことは, 非常に興味結果である.

5 結 言

ラマン分光法, 近赤外分光法を用いた生体の *in situ* イメージング分析というテーマで, 筆者の近年の研究成果を紹介してきた. メダカ胚発生の近赤外イメージングの研究では, 胚の代謝活性の違いを水の水素結合ネットワークの違いを通して捉えることができた. 本結果は, 例えば受精卵の代謝が良く, 今後発生が正常に進んでいくのかを, 水分析を通して判別できる可能性を示している. 今後さらに本研究テーマを進め, “水を通して生体機能や代謝活性を視る” という新たな研究領域を展開したいと考えている. また, 血流の非染色イメージングの結果では, 拍動と生体分子の両方の情報を同時に分析できるところを示しており, 例えば iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導過程のモニタリングなどに応用できる可能性を示唆している. さらに, マウス卵子の研究では, 卵子や受精卵の生体機能や代謝活性を非破壊的に評価するためのバイオマーカーが明らかになる可能性があり, 特に不妊治療分野において, 卵質の新たな評価手法を提示できる可能性がある. 例えば, 胚中の脂質濃度やリン酸濃度をラマン分光法によって非破壊, 非染色に評価し, 受精可能性や生存可能性を予測できるようになると考えられる. そして, 本手法は実際の不妊治療や畜産業において, 分光分析技術の新たな医療応用, 産業応用に繋がると期待される.

分子分光分析を通して生命の輝きを視る, このテーマを今後もさらに発展させ, 生命の神秘を垣間見ることができればと願っている. そして, 生体を生きたまま非侵襲的に評価できる分子分光法を通して, 人の健康や幸せに少しでも貢献できれば幸いである.

謝 辞

本研究の一部は, 日本学術振興会卓越研究員事業, 科学研究費補助金「若手 (B)」(17K18267), 「挑戦的萌芽」(25560212), 特別研究員奨励費 (15J40212) の支援によりなされたことを付記し, ここに謝意を表します. また, 本稿で紹介した研究を推進するに当たり, 尾崎幸洋名誉教授 (関西学院大学), 佐藤英俊教授 (関西学院大学), 橋本秀樹教授 (関西学院大学), 石丸伊知郎教授 (香川大学), 星野由美講師 (日本女子大学), アオイ電子株式会社には大変お世話になりました. この場をお借りして心より感謝申し上げます.

文 献

- 1) F. Siebert, P. Hildebrandt: “*Vibrational Spectroscopy in Life Science*” Wiley-VCH (2008).
- 2) P. Lasch, J. Kneipp: “*Biomedical Vibrational Spectroscopy*”, Wiley (2008).
- 3) Y. Ozaki, C. W. Huck, S. Tsuchikawa, S. B. Engelsen S: “*Near-Infrared Spectroscopy –Theory, Spectral Analysis, Instrumentation, and Applications*”, Springer (2020).
- 4) A. Taketani et al: *Analyst*, **138**, 4183 (2013).
- 5) M. Ishigaki et al: *Analyst*, **141**, 1027 (2016).
- 6) M. Ishigaki et al: *Sci. Rep.*, **7**, 44890 (2017).
- 7) M. Ishigaki, Y. Ozaki: “*Vibrational Spectroscopy in Protein Research*”, Chap.6, Academic Press (2020).
- 8) M. Ishigaki et al.: *Anal. Chem.*, **92**, 8133 (2020).
- 9) M. Ishigaki et al.: *Analyst*, **144**, 1527 (2019).
- 10) M. Ishigaki et al.: *Sci. Rep.*, **7**, 1 (2017).
- 11) M. Ishigaki et al.: *J. Phys. Chem. B*, **121**, 8046 (2017).
- 12) M. Ishigaki et al.: *Anal. Chem.*, **90**, 5217 (2018).
- 13) M. Ishigaki et al.: *J. Biophotonics*, **11**, e201700115 (2018).
- 14) P. Puangchit et al.: *Analyst*, **142**, 4765 (2017).
- 15) M. Ishigaki et al.: *Molecules*, **21**, 1003 (2016).
- 16) M. Ishigaki et al.: *Sci. Rep.*, **6**, 20066 (2016).
- 17) G. E. Nilsson et al.: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **10**, 597 (1980).
- 18) G. A. Holloway Jr., D. W. Watkins: *J. Invest. Dermatol.*, **69**, 306 (1977).
- 19) J. Workman, Jr., L. Weyer: “*Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy*” CRC Press (2012).
- 20) W. Hug, J. M. Chalmers, P. R. Griffith: “*Handbook of vibrational spectroscopy 2002*” John Wiley & Sons (2002).
- 21) T. Sato et al.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 827 (1991).
- 22) S. Holly et al.: *Spectrochim. Acta A Mol. Spectrosc.*, **48**, 101 (1992).
- 23) P. Robert et al.: *Appl. Spectrosc.*, **53**, 226 (1999).
- 24) S. Šašić et al.: *J. Phys. Chem. A*, **106**, 760 (2002).
- 25) B. Czarnik-Matusiewicz et al.: *Anal. Chim. Acta*, **544**, 15, (2005).
- 26) V. H. Segtnan et al.: *Anal. Chem.*, **73**, 3153 (2001).
- 27) H. Maeda et al.: *J. Near Infrared Spectrosc.*, **3**, 191 (1995).
- 28) W. Qi et al.: *Appl. Opt.*, **54**, 6254 (2015).
- 29) K. R. Dunning et al.: *Biology Reprod.*, **83**, 909 (2010).
- 30) K. E. Latham et al.: *Development*, **112**, 921 (1991).

- 31) P. Haggarty et al.: *Human Reprod.*, **21**, 766 (2006).
- 32) J. Conaghan et al.: *J. Assist. Reprod. Genet.*, **10**, 21 (1993).
- 33) D. K. Gardner et al.: *Fertil. Steril.* **76**, 1175 (2001).
- 34) M. Ishigak et al.: *Analyst*, **146**, 7265 (2021).
- 35) C. Sakai et al.: *J. Assist. Reprod. Genet.*, **28**, 157 (2011).
- 36) Z. Movasaghi et al.: *Appl. Spectrosc. Rev.*, **42**, 493 (2007).
- 37) T. Watanabe et al.: *BMC Cell Biol.*, **11**, 38 (2010).
- 38) P. Haggarty et al.: *Hum. Reprod.*, **21**, 766 (2006).
- 39) I. Hoffmann, et al.: *EMBO J.*, **12**, 53 (1993).
- 40) M. J. Solomon et al.: *Mol. Biol. Cell*, **3**, 13 (1992).
- 41) K. E. Latham et al.: *Development*, **112**, 921 (1991).
- 42) D. H. Giebelhaus et al.: *Dev. Biol.* **98**, 148 (1983).
- 43) M. N. Siamwiza et al.: *Biochemistry*, **14**, 4870 (1975).
- 44) T. Sashima: et al.: *J. Phys. Chem. B*, **104**, 5011 (2000).
- 45) M. Simonyi et al.: *Chirality*, **15**, 680 (2003).
- 46) G. J. Puppels et al.: *Cytometry A*, **14**, 251 (1993).
- 47) M. M. Mendes-Pinto et al.: *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11015 (2013).
- 48) R. Hemley et al.: *Biophys. J.*, **20**, 377 (1977).
- 49) R. L. Christensen et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **430**, 30 (2004).

Table 1: Band assignment of averaged Raman spectra

Peak (cm ⁻¹)	DNA/RNA	proteins	lipids	carbohydrates	others
830	asym str PO ₂ ⁻ DNA/RNA	ring br Tyr			
853		ring br Tyr			
935		C-C BK str			
1004		sym ring br Phe			
1033		Phe			
1048					sym str PO ₄ ³⁻
1084	sym str PO ₂ ⁻	C-N str			sym str PO ₄ ³⁻
1129		C-N str		C-O str	
1250-1275	T, A	Amide III	=C-H ben		
1309		CH ₃ /CH ₂ twi, ben	CH ₃ /CH ₂ twi, ben		
1451		CH def	CH def	CH def	
1656		Amide I	C=C str		

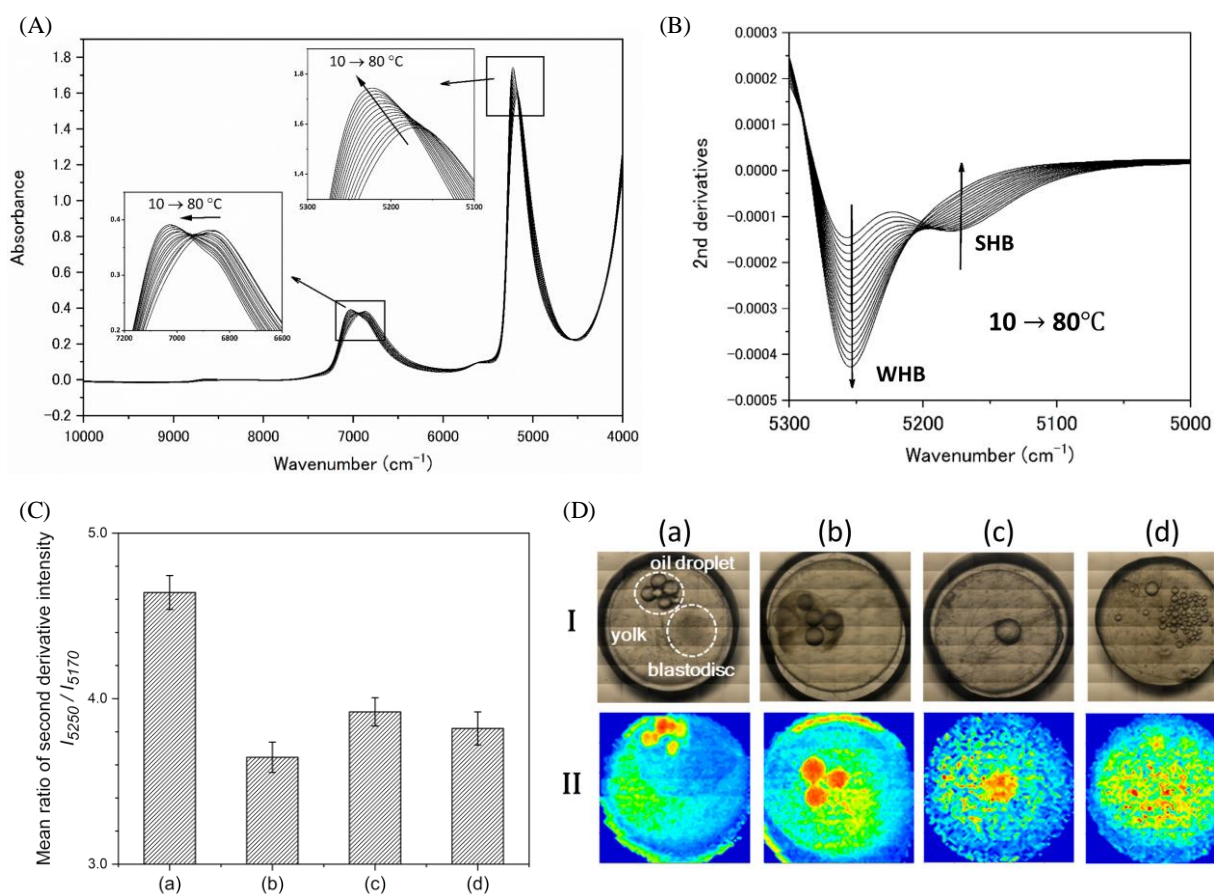


Fig. 2: (A) Temperature dependent variation of NIR absorbance spectra of ultrapure water in the 10000-40000 cm⁻¹ region. (B) The second derivative spectra of (A) in the 5300-5000 cm⁻¹ region. (C) Mean ratio of the second derivative intensities (I_{5250}/I_{5170}) with standard errors. (D) (I) Visible images of the four kinds of fish egg groups. (II) NIR images constructed by plotting the ratio of the second derivative intensities of the water bands defined as I_{5170}/I_{5250} . Reprinted with permission from Ref. 8. Copyright (2020) American Chemical Society.

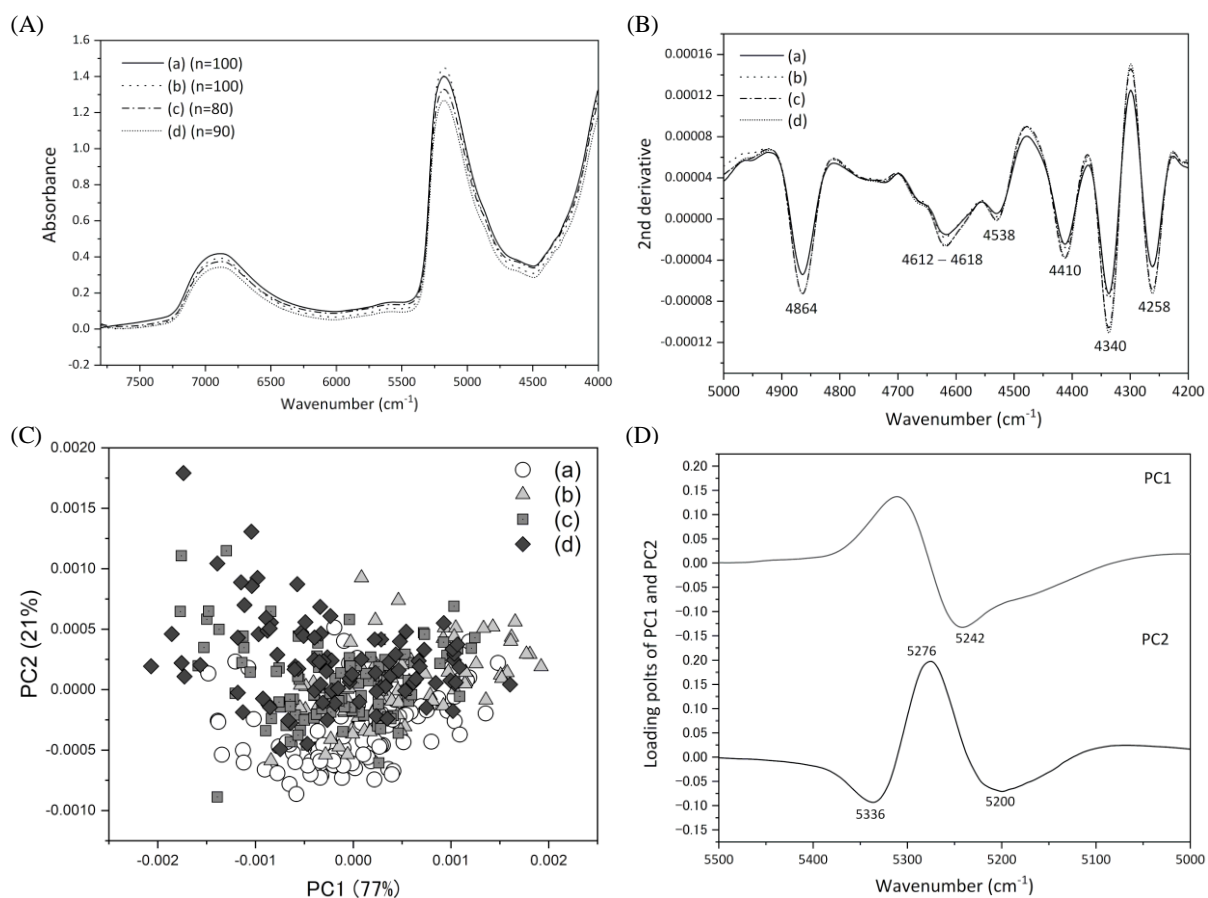


Fig.1: (A) Mean NIR absorbance spectra obtained from four kinds of egg yolk groups. (B) Second derivative of the NIR spectra recorded from the four kinds of egg yolk groups in the 5500–5000 cm^{-1} region. (C) Score and (D) loading plots of PC1 and PC2. Reprinted with permission from Ref. 8. Copyright (2020) American Chemical Society.

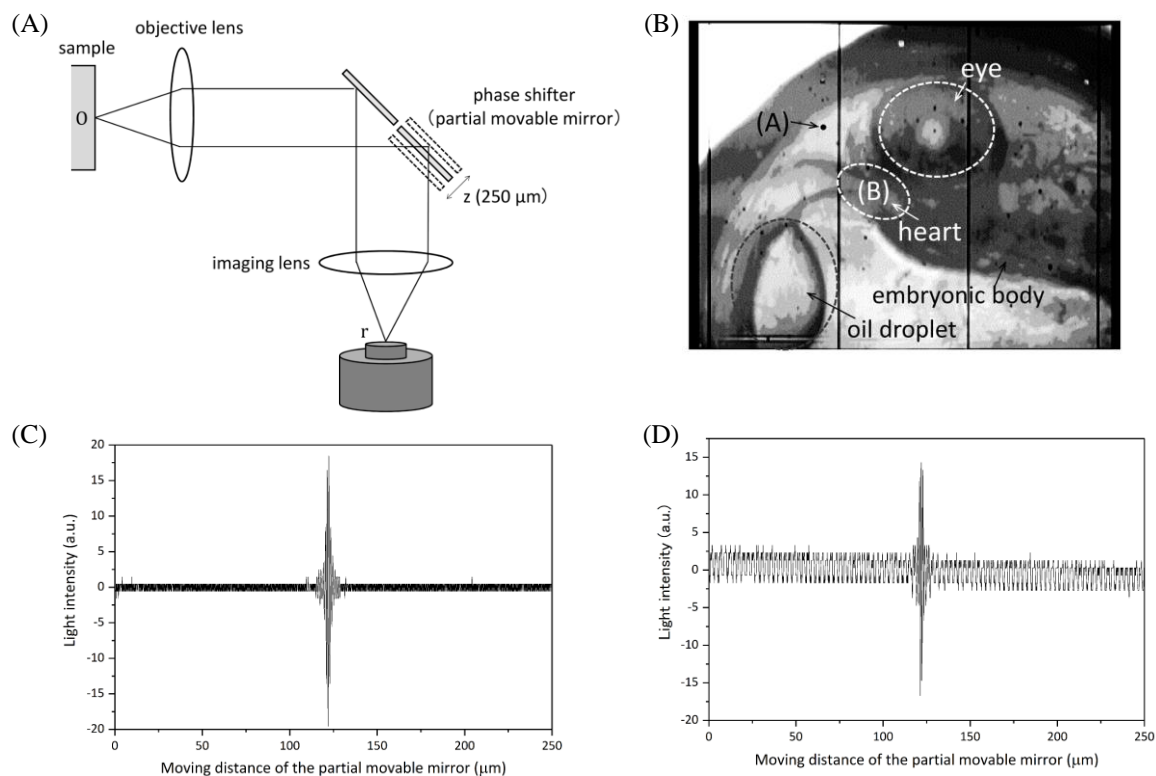


Fig.3: Schematic view of the imaging-type two-dimensional Fourier spectroscopic system (ITFS; AOI ELECTRONICS CO., LTD., NT00-T011). (B) The optical image of an embryonic body of a medaka fish egg on the 5th day after fertilization. (C) and (D) are interferograms obtained from the yolk part at Point (A) and the heart part (B) in Fig.3B, respectively. Reprinted with permission from Ref. 12. Copyright (2018) American Chemical Society.

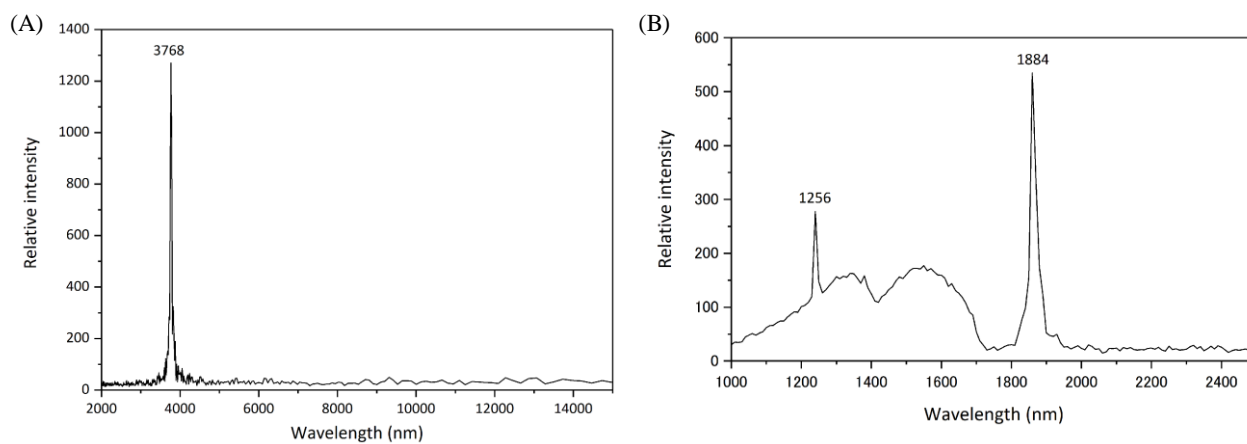


Fig.4: Spectroscopic information obtained by Fourier transformation of the data in Fig. 3D in the (a) 1000–2500 nm and (b) 2000–15000 nm regions. Reprinted with permission from Ref. 12. Copyright (2018) American Chemical Society.

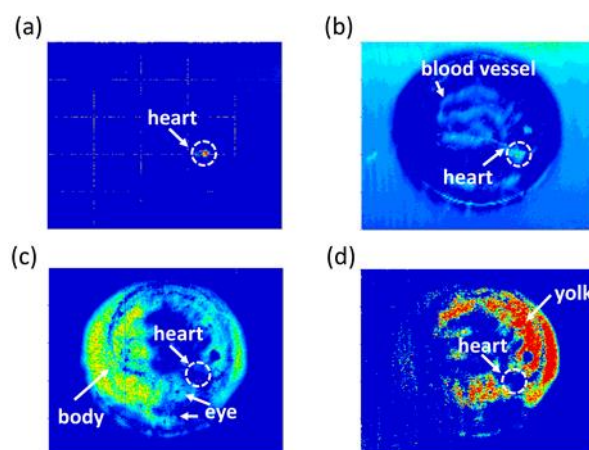


Fig.5: NIR images obtained by plotting (a) light intensity at 2260 nm and absorbance intensity at (b) 1880, (c) 1940, and (d) 2360 nm. Reprinted with permission from Ref. 12. Copyright (2018) American Chemical Society.

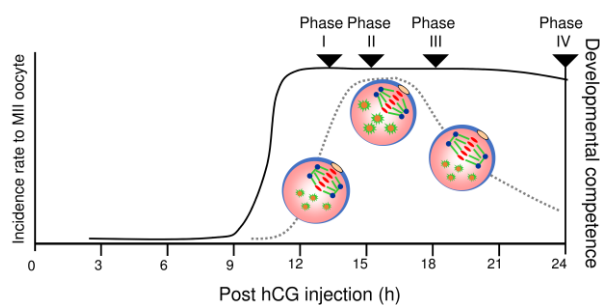


Fig.6: Oocytes were collected at 13, 15, 18 and 24 hours after hCG injection, and were subjected to experiments as Phase I, II, III or IV, respectively. Solid and dashed lines indicate incidence rate to Metaphase II oocyte and developmental competence, respectively. Reprinted with permission from Ref. 9. Copyright (2019) The Royal Society of Chemistry.

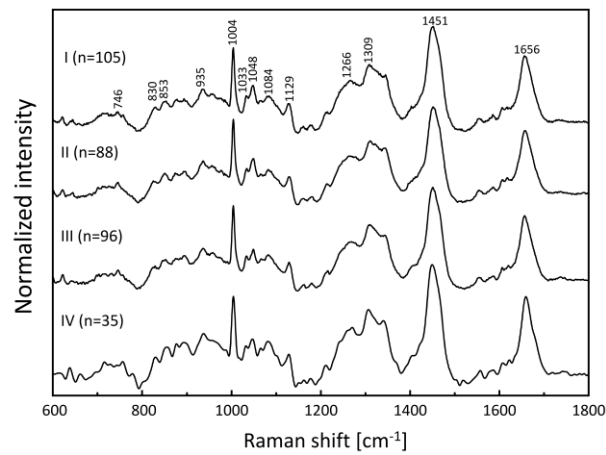


Fig.7: (A) The averaged Raman spectra in the 1800–600 cm^{-1} region of mouse embryos obtained from Phase I ($n = 105$), II ($n = 88$), III ($n = 96$), and IV ($n = 35$) after injection of hCG hormone. Reprinted with permission from Ref.9. Copyright (2019) The Royal Society of Chemistry.

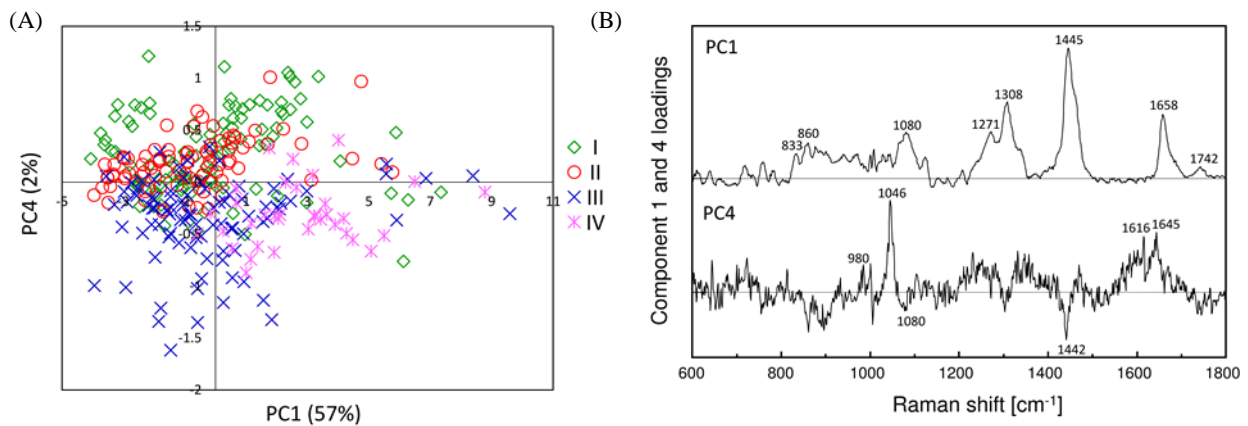


Fig.8: (A) Score plots of PC1 vs PC4 of PCA performed on the data set of mouse oocytes in all maturation stages. (B) Loading plots of PC1 and PC4 of PCA in (A). Reprinted with permission from Ref. 9. Copyright (2019) The Royal Society of Chemistry.

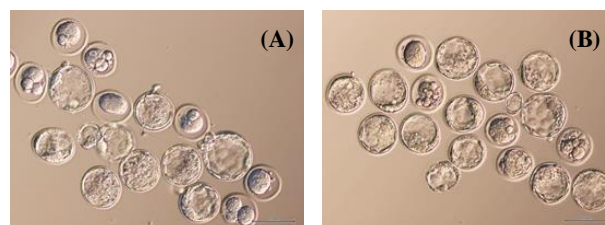


Fig.9: Visible image of embryos incubated for five days; (A) laser irradiated and (B) non-irradiated embryos. Several blastocysts and morula can be seen and some of them already hatched in both (A) and (B). Reprinted with permission from Ref. 9. Copyright (2019) The Royal Society of Chemistry.

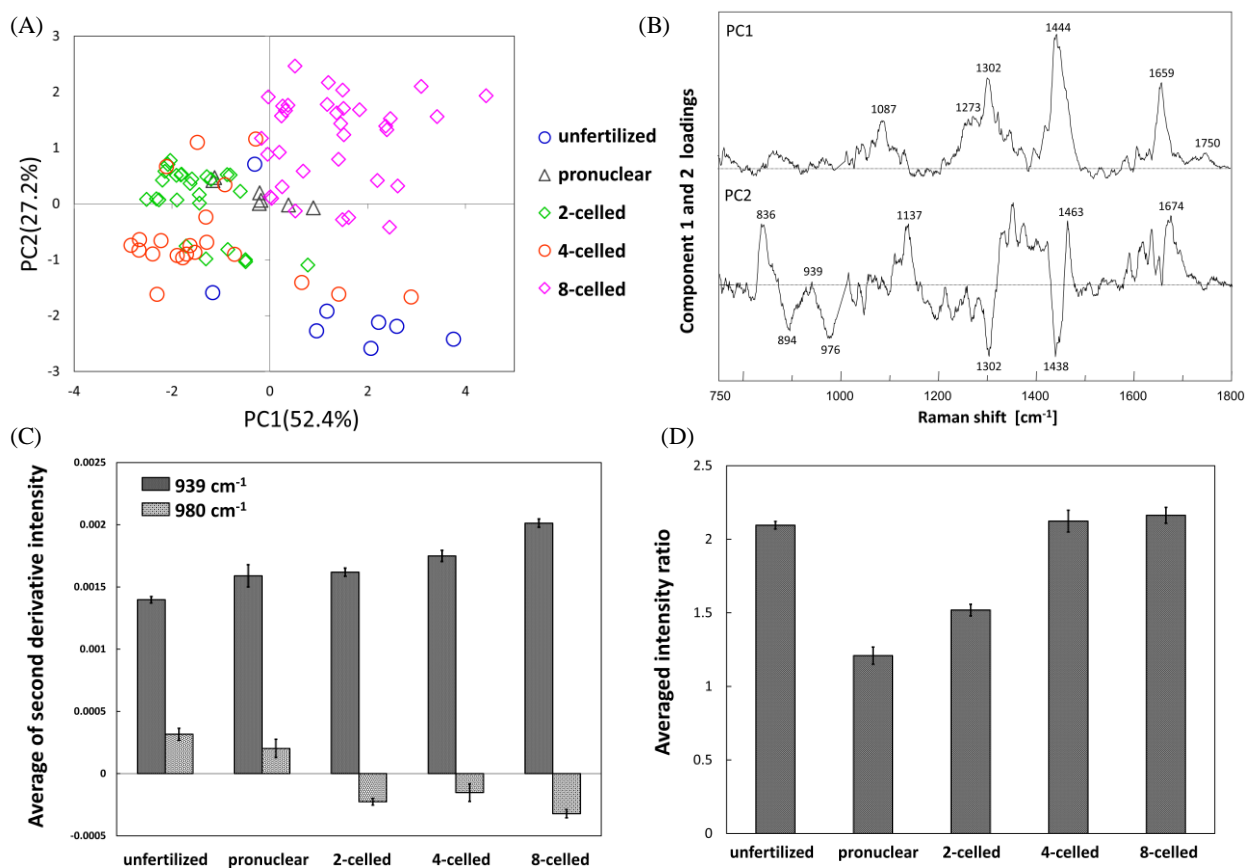


Fig.10: (A) Score plot of PCA performed for datasets of all developmental stages. (B) Loading plots of PC1 and PC2 for PCA in (A). (C) The averaged intensity of the second derivative with the standard error at 939 and 980 cm^{-1} . (D) The averaged intensity ratio for the tyrosine doublet (I_{855}/I_{830}) with the standard error for the five stages. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Scientific Reports (Ref.10), copyright (2017).

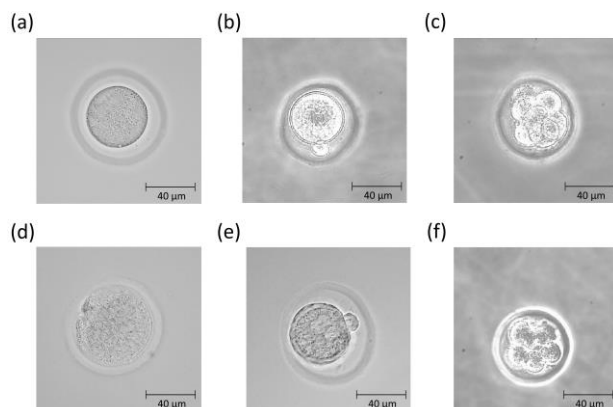


Fig.11: Examples of embryos (a–c) with high-grade morphological features in unfertilized, pronuclear, and 8-celled stages and (d–f) with low-grade morphology. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Scientific Reports (Ref.10), copyright (2017).

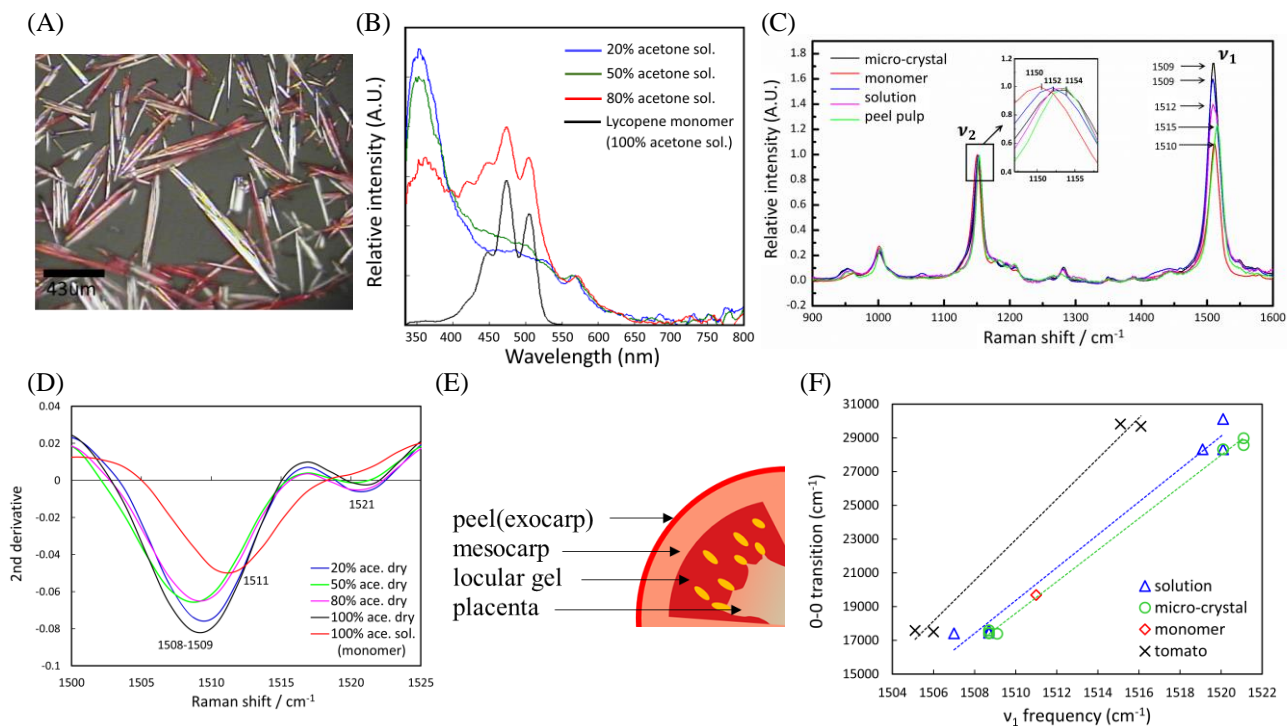


Fig.12 (A) The dry micro-crystals of lycopene on quartz glass. (B) UV-VIS spectra of lycopene acetone/water solutions. (C) Averaged resonance Raman spectra of micro-crystals, acetone/water solutions, and tomato fruits measured with 532 nm excitation. (D) The 2nd derivative spectra of lycopene dry micro-crystal and 100% acetone solution obtained using 532 nm excitation. (E) The detail structure of tomato tissue. (F) The plot of the frequency of the ν_1 Raman band (cm^{-1}) at 532 nm excitation versus the $S_0 \rightarrow S_2$ transition energy (cm^{-1}) of lycopene *in vitro* and *in vivo*. Reprinted with permission from Ref. 11. Copyright (2017) American Chemical Society.

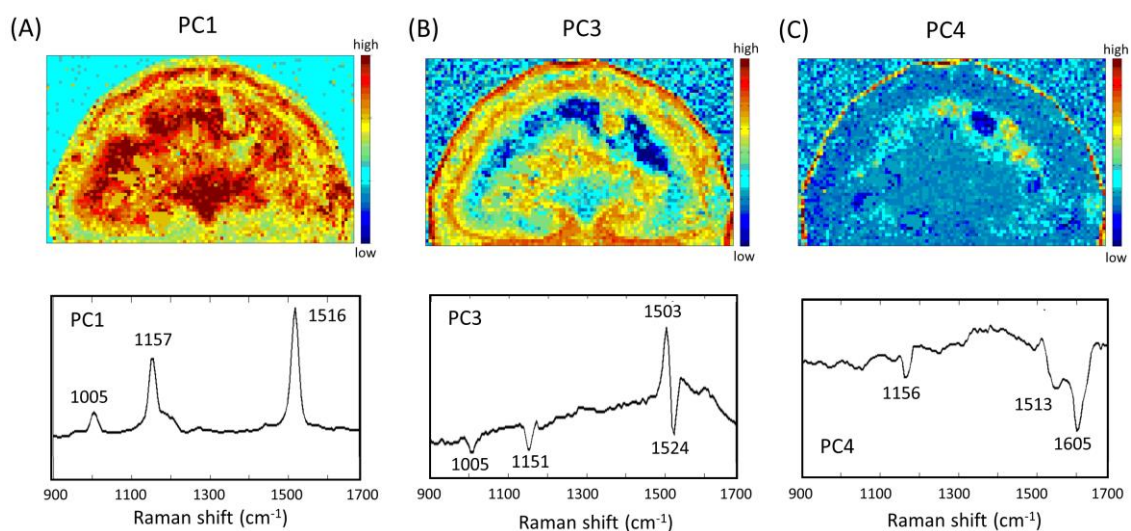


Fig.13: Raman image of the section of a tomato fruit using PCA. (A), (B), and (C) are drawn by plotting the PCA scores of PC1 (the H-aggregate of lycopene), PC3 (the J-aggregate of lycopene), and PC4 (wax component), respectively. Reprinted with permission from Ref. 11. Copyright (2017) American Chemical Society.

In situ imaging of living organisms using Raman and near-infrared Spectroscopies
—Look into the brilliance of life through molecular spectroscopies—

Mika ISHIGAKI^{1,2}

E-mail : ishigaki@life.shimane-u.ac.jp

¹ Institute of Agricultural and Life Sciences, Academic Assembly, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue, Shimane, 690-8504, Japan

² Raman Project Center for Medical and Biological Applications, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

Raman spectroscopy can obtain spectral information strongly reflecting the molecular structure in a non-destructive manner, and near-infrared (NIR) spectroscopy can simultaneously analyze molecular composition, molecular concentration, and the interaction between the biomolecules such as proteins and water. By using both spectroscopies in a complementary manner, interdisciplinary research of analytical chemistry, physical chemistry, and biophysical chemistry have been achieved. In this review, three topics of my recent research are introduced. The first one is about non-staining *in situ* imaging of medaka fish eggs using NIR spectroscopy. The activation of egg development was captured by detecting the changes of the hydrogen bond network of water molecules, and optical interferences caused by Doppler effect made it possible to get blood flow images of fish embryos. In the second topic, it was revealed that the mouse oocyte maturation and the embryonic quality were able to be assessed *in situ* by Raman spectroscopy. The concentration of lipids and phosphoric acids could be biomarkers for discriminating fertilization and viability competences of embryos, and the results presented a new possible evaluation method of embryonic quality to assisted reproductive technologies. Furthermore, in the third topic, the distributions of lycopene aggregations within tomato fruits were visualized using resonance Raman imaging. J- and H-aggregates were distributed in layers under an exocarp, the linear relationship between the frequencies of Raman band (ν_1) and the electronic transition energy ($S_0 \rightarrow S_2$) shifted by forming aggregations was interpreted in terms of differences of effective C=C chain length. The mystery why life can exist strongly attracts my interests. It is my great pleasure for continuously seeking to catch the brilliance of life through molecular spectroscopies.

Keywords : Raman spectroscopy; near-infrared spectroscopy, *in situ* imaging