ラマン分光法を用いた神経細胞成熟過程の観察

橋本剛佑, 松吉ひろ子, 佐藤英俊

関西学院大学理工学部生命医化学科

1. はじめに

神経細胞は、外界刺激にさらされた経験の無い開眼前動物の視覚野においても、自発的に活動電位を発している。さらに、外界からの刺激が無い状態でも回路網を構築して活動している。生体と同様、培養環境下におかれた神経細胞も、自律的に突起を伸展させ、外部からの刺激が無くとも電気的なシグナル伝達を行うことができる¹⁾。胎生 17～19 日のラット海馬から採取した神経細胞では、培養を開始してから 10 日ほどで自発活動が見られ、60 日以上長期培養した系においては、高頻度の発火が繰り返し現れる「スーパー・バースト」と呼ばれる発火様式が確認できるようになる²⁾。この培養細胞で見られる現象は、回路網を構築する神経細胞の生理学的特性が、培養系でも高度に保存されていることを示唆している。著者等は神経細胞が機能を獲得してゆく過程、すなわち成熟の程度を無侵襲的に分析する技術の開発を目的とし、ラマン分光分析を応用した技術開発研究を行っている。神経細胞は他の体細胞と異なり、個体の発生から成長の初期にかけて細胞分裂を行うが、一定の年齢で細胞数の増加が停止する。従って、神経細胞の増殖や組織化が顕著に進行する胎児から乳幼児にかけては、外部から与えられる化学的刺激の影響を大人より強く受けると考えられる。

本稿で紹介する技術は、成熟過程の神経細胞に対する外因刺激（化学物質等）の影響を検出する手段として開発・応用を目指している。化学物質の細胞への影響が未知の場合、特定の遺伝子やタンパク質の発現を検出する分子生物学的手法の使用は、費用および時間的に困難である。従って、長時間に亘る無侵襲経時計測が可能で、かつ、分子組成変化を高感度に検出できるラマン分光法は最適な観察技術である。ラマン分光分析は振動分光法の一つであり、散乱光の波長シフトから分子の構造や組成を非破壊・非侵襲に分析できる

技術である。励起光を物質に入射すると、同じ振動数の散乱光（レイリー散乱光）だけでなく、励起光と異なる振動数の光（ラマン散乱光；図 1）が生じる。励起光とラマン散乱光の振動数の差は分子振動の励起エネルギーに相当するため、散乱光を波長毎に分ける（分光する）ことで、分子の同定や測定対象の分子組成を知ることができる。近年、レーザー光源や光学素子、検出技術の発展により組織や細胞などの生体試料から質の高いラマンスペクトルを再現性良く得ることが可能となった。試料の前処理を必要とせず、そのままの状態でも非侵襲的に分子の情報を得られる利点から、細胞種類の判別³⁾、がん組織の診断^{4), 5)}、細胞分化のモニタリング^{6), 7)}、ウイルス感染の検出⁸⁾、受精卵の品質検査⁹⁾といった医学・生物学分野への応用が期待されている。本研究ではラット胎児から摘出した発達初期の神経細胞を用い、外因刺激を与えずに培養、ラマン測定を行った。培養時間経過に伴う分子組

図 1 ラマン分光法の原理 (a), およびエネルギーダイアグラム (b).

成変化を解析し、神経細胞の成熟過程の標準モデルを構築した²⁾。

2. 神経細胞の培養

細胞の予定運命が決定している胎生 17～19 日のウィスターラット胎児から海馬を採取し、パパイン (0.5 mM) を用いて神経細胞を分散させて結合組織と分離・回収した。測定に適した密度 (40 個/mm²) で石英ガラス窓付き培養皿に細胞を播種し、37°C、CO₂ 濃度 5% 環境下、B27 サプリメント、L-グルタミン、ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した Neurobasal A 培地中で初代培養を行った。

3. 共焦点ラマン顕微鏡

ラマンスペクトル測定には正立顕微鏡を備えた共焦点ラマン顕微鏡 (Nanofinder, 東京インスツルメンツ; 図 2) を用いた。この装置は、上下左右に移動可能なクロスリットを採用した共焦点光学系を持ち、スリットの開口は縦横 100 μ m、空間分解能は横方向で約 1 μ m である。加えて、小型 CO₂ インキュベータチャンバー (東海ヒット) を備え、培養条件と同じ 37°C、5%CO₂ の環境でラマン測定が可能である。さらに、パルス誘導精密電動ステージ (QT-AMH2, 中央精機) を搭載し、マイクロメートルの精度で測定位置

の設定が可能である。励起光源には、無背景放射電子制御波長可変チタンサファイアレーザー (BF-ETL) を用いた。励起波長は 785 nm で試料位置でのレーザー強度は約 30 mW であった^{10), 11)}。対物レンズは 60 倍の水浸レンズ (NA1.1, LUMFLN, オリンパス) を用い、レーザー照射とラマン散乱光の集光を同じレンズで行った (後方集光方式)。また、分光には 600 lines/mm、750 nm ブレーズのグレーティングを用い、検出には CCD 検出器 (DU401A-BR-DD, Andor Technology) を用いた。

試料から得られるラマンスペクトルには、共焦点システムが制限する焦点の体積 (約 1 $\times$ 1 $\times$ 5 μ m³) 内に存在する全ての分子の情報が含まれている。実際の測定では、細胞由来の情報以外に培養液や培養皿等の情報もわずかに含まれるため、スペクトルの差分を取ることでこれら不要な情報を除去した。また、蛍光や検出器の電氣的雑音などによる影響を取り除くため、多項式近似を用いたベースライン補正を行った。また、神経細胞の成熟と共に細胞の厚さが変化するため、分子組成の変化を解析するためにはスペクトル強度の標準化が必要である。神経細胞では、タンパク質、脂質、核酸等全ての生体物質に含まれる CH の変格振動によって生じるバンド (1450 cm⁻¹ の CH 変角振動モード) の強度で規格化した。

4. 神経細胞のラマンスペクトル

各培養日数における神経細胞の核から取得したラマンスペクトルを図 3 に示す。1663 cm⁻¹ の幅の広いバ

図 2 ラマンシステムの光学図 (a), および測定部周辺の写真 (b)。

図 3 各培養日数 (DIV) における神経細胞の核のラマンスペクトル。

ンドには、タンパク質のアミド I 振動モードと C=C 伸縮振動モードのバンドが重なって含まれる^{2)-5), 8)}. 1251 cm⁻¹ に観測されるバンドはアミド III 振動モードに、1093 cm⁻¹ に観測されるバンドは核酸のリン酸基の対称伸縮振動に由来する. 1003 cm⁻¹ に観測される鋭いバンドは、フェニルアラニンのフェニル基が振動する環呼吸振動モードに帰属できる. 785 cm⁻¹ に観測されるバンドは核酸のホスホジエステル結合に帰属する¹²⁾. 培養 2 日目のラマンスペクトルは他の培養日数と比べ、核酸由来のバンド (785 cm⁻¹) の強度が強く、培養 2 日目では、神経細胞核内の核酸の濃度が、タンパク質や脂質と比べて相対的に高いことを示唆している. しかしながら、各培養日数のラマンスペクトルには生体物質由来のバンドが共通して現れ、形状も類似しており、スペクトルデータの統計学的処理を行うことなく培養日数経過に伴う細胞内分子組成の変化を判断するのは困難である.

5. ケモメトリックスによる解析

ケモメトリックスは、化学 (chemistry) と計量学 (metrics) からなる合成語であり、多変量情報に対して統計学的手法を適応し、目的とする情報を抽出する技術である. ケモメトリックスには多種多様な解析法があるが、最も基礎的で応用範囲が広いのが主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) である. スペクトルの解析に用いる場合は、観測した各波数に対して次元を割り振り、光の強度を各次元の値とする多次元ベクトル空間を定義する. この多次元空間の中でスペクトルは一つの点としてプロットされる. 例えば本計測に用いた顕微ラマンシステムの場合、CCD 検出器が横方向に 1024 個のピクセルを有するため、スペクトルデータは 1024 列のデジタルデータとして記録される (一つ一つのスペクトルデータは 1024 個の変数を持つ). 従って、1024 次元の座標を定義する時、測定したラマンスペクトルは座標上の 1 点として考えることができる. この座標に多数のスペクトルをプロットし、データの分散が最も大きくなるような方向に沿って新たに座標軸となる主成分 1 (PC1) を定義することができる. 以後、PC1 に直交して順次大きな分散を持つ方向に沿って、PC2, PC3 と新たな座標軸を定義する. これらの主成分の内 2 つまたは 3 つを選び出してデータをプロットしたものがスコアプロットと呼ばれる. また、分散を示すベクトルを全座標軸の合成ベクトルとして表記し、各座標の寄与をプロットしたものはローディングプロットと呼ばれる.

全ての培養日数での神経細胞のラマンスペクトルを

用いた PCA より得られた PC1 ~ 3 軸に対するスコアプロットを図 4 に示す. 人間は 1024 次元の空間を認識することは極めて困難であるが、3 次元での表記は容易に理解できる. 適切な PC 軸を選択することにより、目的にあった情報だけを抽出することも可能である. 例えば、図 4 の角度からスコアプロットを見ると、培養 2 日目、培養 8 ~ 30 日目、培養 45 ~ 105 日目、そして培養 120 日目のデータで構成される 4 つのグループにスペクトルデータが判別されていることが分かる. 図 5 には PC1 から PC3 のローディングプロットを示す. PC1 のローディングプロットでは 788, 1095, 1487, 1576 cm⁻¹ に強いバンドが観測され、これらのバンドは DNA に帰属できる. 培養初期 (2, 8 日目) のデータセットは他の培養日数のデータセットと

図 4 PCA スコアプロット. PCA により算出された PC1 と PC2, PC3 を軸とした 3 次元プロットである. 軸ラベル括弧内の数値は寄与率を示す.

図 5 PCA ローディングプロット.

比べPC1のスコア値が比較的高く、DNAの濃度が相対的に高いことを反映している。PC2のローディングプロットでは1003, 1031 cm⁻¹に現れるフェニアラニンのバンド、1126 cm⁻¹のC-N伸縮運動、1243 cm⁻¹のアミドIIIのバンドなどタンパク質に由来するバンドが観測される。

ラット海馬神経細胞を培養すると、成熟に伴い同期バースト現象が見られる¹⁾。この知見は、神経細胞の自律的な回路網構築メカニズムが細胞単位で高度に保存されていることを示唆しているが、得られたラマンスペクトル(図3)の解析結果も従来の電気生理学的手法で報告される結果と一致しており、ラマン分光で細胞内分子組成変化を検出することによって神経細胞の成熟段階を予測できることを強く示唆している²⁾。

6. まとめ

ラット胎児から得られた発達初期の神経細胞が、培養日数の経過に伴い成熟し、それに伴い分子組成を変化させていく様子を、ラマン分光法を用いて無侵襲的に観測することに成功した。ケモメトリックスを用いたデータの解析結果は、分子組成変化が神経細胞の機能獲得と同期して生じていることを強く示唆するものであった。本結果は、培養条件下での正常な神経細胞の成熟モデルとして利用することができる。さらに、化学的外部刺激が神経細胞発達へ与える影響を研究する基盤となる情報でもある。本成果は、光計測による神経細胞の機能解析への序論であり、ラマン分光法が脳機能研究や病態解明、治療薬開発などの分野へ展開可能な技術であることを示している。

文 献

- 1) 清原 藍ら (2009) 電気学会論文誌 C 129, pp. 1815-1821.
- 2) Hashimoto, K. *et al.* (2015) *Analyst* **140**, 2344-2349. DOI: 10.1039/c4an01961j.
- 3) Oshima, K. *et al.* (2010) *J. Biomed. Opt.* **15**, 017009-1-8. DOI: 10.1117/1.3316296.
- 4) Taketani, A. *et al.* (2013) *Analyst* **138**, 4183-4190. DOI: 10.1039/c3an00169e.
- 5) Ishigaki, M. *et al.* (2016) *Analyst* **141**, 1027-1033. DOI: 10.1039/C5AN01323B.
- 6) Chan, J. W. *et al.* (2009) *Anal. Chem.* **81**, 1324-1331. DOI: 10.1021/ac801665m.
- 7) Ghita, A. *et al.* (2012) *Anal. Chem.* **84**, 3155-3162. DOI: 10.1021/ac202994e.
- 8) Moor, K. *et al.* (2014) *J. Biomed. Opt.* **19**, 067003. DOI: 10.1117/1.JBO.19.6.067003.
- 9) Ishigaki, M. *et al.* (2014) *Anal. Methods* **6**, 9206-9211. DOI: 10.1039/C4AY01037J.
- 10) Sato, H. *et al.* (2002) *Appl. Spectrosc.* **56**, 1303-1307. DOI: 10.1366/000370202760355019.
- 11) Sato, H. *et al.* (2000) *Appl. Spectrosc.* **54**, 1163-1167. DOI: 10.1366/0003702001950977.
- 12) Movasaghi, Z. *et al.* (2007) *Appl. Spectrosc. Rev.* **42**, 493-541. DOI: 10.1080/05704920701551530.

橋本剛佑

橋本剛佑 (はしもと こうすけ)

関西学院大学大学院理工学研究科
研究内容: ラマン分光法のバイオメディカル分野
応用のための要素技術開発
連絡先: 〒669-1337 兵庫県三田市学園2丁目1番地
E-mail: ko-hashimoto@koto.kpu-m.ac.jp

松吉ひろ子

松吉ひろ子 (まつよし ひろこ)

関西学院大学理工学部生命医化学科助教
連絡先: 同上
E-mail: matsu-hi@kwansei.ac.jp

佐藤英俊

佐藤英俊 (さとう ひでとし)

関西学院大学理工学部生命医化学科教授
研究内容: 光による定量的生物学および医用光学
連絡先: 同上
E-mail: hidesato@kwansei.ac.jp