特集：生体分子振動領域での新しいレーザー診断・治療

解説**REVIEW ARTICLE****動脈硬化症診断のための分光分析技術**佐藤 英俊^{1*}, 小町 祐一¹, 朝倉 徹², 下瀬川 徹², 會沢 勝夫³, 田代 英夫¹¹独立行政法人理化学研究所 田代分子計測工学研究室²東北大学 大学院医学系研究科³東京医科大学 第2生理学教室

(平成16年6月1日受理, 平成16年7月1日掲載決定)

Advanced spectroscopy for diagnosis of arteriosclerosisHidetoshi Sato^{1*}, Yuichi Komachi¹, Toru Asakura², Toru Shimosegawa², Katsuo Aizawa³ and Hideo Tashiro¹¹*Probing Technology Laboratory, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research)*²*Department of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine*³*Department of Physiology, Tokyo Medical University*

(Received June 1, 2004, Accepted July 1, 2004)

要 約

我々は医学生物学研究のための先進的な分析技術の開発を目指し、電子制御波長可変レーザーを基礎とした新しいラマン分光分析技術、および新しい分光ツールの開発を行っている。そのために現在、1)蛍光による妨害を除去してラマンシグナルを抽出する手法、2)共鳴ラマンスペクトルに埋もれた非共鳴分子種のラマンスペクトルを抽出する手法、3)直径750 μm 以下のラマンプローブ、の3つの開発研究を行っている。本総説では、3つの新しい分光技術、直径600 μm のマイクロラマンプローブの開発について概観する。

キーワード：ラマン分光法、オプティカルバイオプシー、近赤外ラマン分光法、ラマンプローブ

Abstracts

Our major goal is to develop advanced analytical techniques for biomedical researches based on the Raman spectroscopic applications of an electronically tuned Ti:sapphire laser and the developments of advanced spectroscopic tools. Three studies are on going in our laboratory: 1) extraction of Raman signals from fluorescent interference, 2) extraction of Raman signals of no-resonant species in the presence of resonant species, 3) development of fiber-optic Raman probes less than 750 μm in diameter. Three new spectroscopic techniques and the development of a micro Raman probe 600 μm in diameter are reviewed in the present paper.

Key Words: Raman spectroscopy, Optical Biopsy, NIR-Raman spectroscopy, Raman probe

¹〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1
(2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-0198, Japan)

²〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1
(Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi, 980-8575, Japan)

³〒160-8402 東京都新宿区新宿6-1-1
(6-1-1 Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8402, Japan.)

1. はじめに

1973年にCrispinとVan Baarleが直径5mmの血管内視鏡を開発し¹⁾、ヒト死体の血管内を観測して以来、血管内視鏡の細径化が進められてきた。現在では直径750 μm 以下のものが市販されており、直接的に患部を観察できる優れた手法として認知されている。動脈硬化症の診断において血管内視鏡で観測するのは患部(プラーク)の形態と色の変化である²⁾。特に患部の黄色の濃さは悪性度の指標として使われており、重要なパラメータとされている。しかし、患部の色は脂質中に取り込まれたカロテノイド色素の濃度を表しており、絶対的な診断基準としては十分ではないとも考えられる。最近では動脈硬化症でも血管の外側へ拡大するように成長する期間が長いことも指摘されており³⁾、形態と色の変化だけで動脈硬化巣を診断するには、医師の観察力と経験が頼りである。動脈硬化症の診断法としてこの他に、IVUS (IntraVascular Ultra Sound), OCT (Optical Coherence Tomography), 血管造影法, X線CT, MRI, 等があるが、どれも基本的に形態変化を観察するための手段である。形態変化そのものは、一般的に何らかの分子レベルでの変化が引き金となって起きる。動脈硬化の場合はコレステロールやトリグリセリドのような脂質分子がマクロファージなどの働きによって蓄積することから始まる³⁾。従って、生体中で分子レベルの情報を獲得することは病変のメカニズムを理解する上で重要であり、侵襲性の低い観測手法があれば、研究においても診断においても頼もしい補助的手段となり得る。

ラマン分光法はこの目的に対して、原理的に最も優れた分析法の一つである⁴⁾。患部へレーザーを照射し散乱され返ってきた光の中には、元のレーザー光の振動数 ν_0 (波長 $\lambda_0 = c/\nu_0$, c : 光速) とは異なる振動数 $\nu_0 \pm \nu_1$, $\nu_0 \pm \nu_2$, $\nu_0 \pm \nu_3$, $\dots$ の光が含まれており、これがラマン散乱光(ラマンバンド)である。(Fig.1 参照) ν_1 , ν_2 , $\nu_3 \dots$ をラマンシフトと呼び、単位は(cm^{-1})で表される。ラマンシフトは分子に特有の振動状態である振動モードを反映しており、分子の特定に用いられる他、存在環境の変化や構造変化を解析するために使われる。 $(\nu_0 - \nu_1)$ 側をストークス散乱、 $(\nu_0 + \nu_1)$ 側をアンチストークス散乱と呼び、通常は強度の強い前者のみを計測する。同様にレーザーによって励起されて発生する光として蛍光がよく知られている。蛍光は励起レーザー波長(λ_0)に対して蛍光バンド波長(λ_f)が $\lambda_f > \lambda_0$ ($\nu_f < \nu_0$)の条件で発生し、ラマン散乱光のような励起波長との密接な関係を持たない。蛍光は一般的に分子の一部に二重結合共役系等の色素部分がある場合のみ発生するのに対し、ラマン散乱光は色素部分が無い分子でも発生する。従って、ラマン分光分析は様々な分子の分析に用いることができる。

ラマン分光法を生体分析に用いる利点は、1) 水のラマンシグナルが弱くその他の分子の分析の妨げにならない、2) 試料の前処理が不要で侵襲性が低いことにある。従来In vitroのラマン分光研究では、動脈硬化症以外の病

Fig.1 A conceptual diagram of Raman scattering light and fluorescence.

変に対しても様々なアプローチがなされている。Manoharan等が1992年に動脈硬化部位の診断にレーザーラマン分光分析が使えることを指摘し⁵⁾、2000年にはBuschman等がラマンプローブを用いて、動脈内の分子組成をin vivoで分析した⁶⁾。しかし、in vivoでのラマン分析研究は従来期待されてきたほどの広がりを見せていない。それはラマン分光法が実用上の問題をいくつか抱えているからである。以下に分光技術上の問題とツール上の問題について述べた後、我々の取り組みを紹介する。

2. 生体ラマン分光分析の分光技術上の問題

In vivoラマン分光法を実用的な分析手法として発展させるためには、いくつかの問題がある。その一つは生体組織が発する蛍光である。蛍光の問題については古くから議論されてきており、その結果生体試料が蛍光を発生しにくい、近赤外の励起波長を用いるラマン分光法が発展してきた^{4,7)}。近赤外の励起光を用いるラマン分光法には大きく分けて二つのタイプがある。その一つがフーリエ変換 (FT) ラマン分光法である⁸⁻¹⁰⁾。(Fig.2 (a) 参照) Nd:YAGレーザーの1064nmの発振線を励起光として用い、InGaAsやGeのシングル検出器を用いてFT方式で検出する。 $\lambda_f > 1064\text{nm}$ となる生体蛍光物質は少ないため、多くの生体試料のラマンスペクトルを得ることが可能である。しかし、ラマンシグナルの強度 I_R はラマンバンドの絶対波数の4乗に比例する($I_R \propto (\nu_0 \pm \nu_1)^4$; ν^4 則)ため、1064nm (9398 cm^{-1})の励起光を使うと検出感度が低く、スペクトル測定に時間がかかるという欠点を生ずる。もう一つのタイプは、1990年頃から市販され始めた高感度CCD検出器と小型で明るく使いやすい分光器を用いる、近赤外励起(NIR)ラマン分光法である¹¹⁻²⁴⁾。(Fig.2 (b) 参照) 700-860nmの近赤外レーザーを励起光源に用い、CCD検出器の感度の高さを頼りに短時間でラマンスペクトルを測定できる。後述するラマンプローブとの接続も容易であり、生体ラマン分光研究の主流となっている^{7,11-24)}。

CCD検出器は原理的に検出限界波長が1100nm付近にあり、励起波長が長くなるにつれ急激に感度が低下する。

Fig.2 Schematic representations of FT-Raman (a) and CCD-based NIR-Raman (b) spectrometers.

Fig.3 に CCD 検出器 (DU401-BR-DD, Andor), グレーティング (600 本/mm, プレーズ波長 750 nm) を 3 枚装備したトリプルラマン分光器 (NRS-2100, 日本分光) の感度曲線を示す. (780, 930 nm 付近の透過率の落ち込みはグレーティングの Wood 異常回折による.) 図中に 0~3000 cm^{-1} のラマンシフト領域を 700~850 nm の励起光で測定する場合の検出波長領域を矢印で示しており, 励起波長が長いほど検出感度が低くなること, また 850 nm の励起光を用いると, 3000 cm^{-1} 付近のバンドは測定できないことが分かる. 一方, 蛍光を避けるためには長い励起波長を用いることが有利である. Fig.4 には, 励起レーザー強度およびその他の測定パラメーターが一定の時に, (a) 700, (b) 800, (c) 900 nm 励起で測定したマウス小腸のラマンスペクトルを示す. スペクトル (b) と (c) は強度を 10 倍して表示している. 1668, 1457, 1009 cm^{-1} のバンドはそれぞれタンパク質のアミド I および CH_2 変角振動, フェニルアラニンのベンゼンリングの伸縮振動に帰属できる. 900 nm 励起で測定したスペクトル (c) ではわずかに 1009 cm^{-1} のバンドが観測されるだけで, 高波数側は CCD 検出器の検出波長を逸脱してしまっている. 図中スペクトル (a) と (b) のバンド強度を比較すると, 700 nm 励起の方が 800 nm 励起に比較して約 10 倍高い感度で測定できたことが分かる. 一方, 試料が発する蛍光によるベースラインの持ち上がりは, 700 nm 励起のスペクトルでずっ

Fig.3 A response spectrum of our Raman system equipped with a deep-depleted CCD detector and bars showing excitation wavelengths and corresponding Raman spectral ranges.

Fig.4 Raman spectra of a mouse colonic mucosa measured with 700 (a), 800 (b) and 900 (c) nm of excitation wavelengths. The spectra (a) and (b) are 10 times magnified in intensity. *A band with asterisk is due to spontaneous background noise leaking from the BF-ETT laser.

と強く, ベースラインの不安定さにより 700 nm 励起ではスペクトルの質が低くなることも分かる. 従って, 実際に NIR ラマン分光法を生体に応用する場合には, 測定試料の蛍光発生強度に合わせた励起波長の選択を行う必要がある.

Fig.5 に示すのは, 850 nm 励起で測定したマウス肝組織のラマンスペクトルである. スペクトル中に観測される 1607, 1449, 1207 cm^{-1} のバンドは, 肝組織中に分布しているビリベルジン (biliverdin) 誘導体と考えられる色素による共鳴ラマンバンドであり, 細胞組織自体のスペクトルではない²⁵⁾. 肝炎ウィルス感染による肝炎, 肝硬変を経て肝ガンに至る経路は, 炎症による NO ヘモグロビンの発生やタンパク質繊維化等, 明らかな分子組成の変化を伴うため, ラマン分光分析が威力を発揮すべきタ

Fig.5 A Raman spectrum of mouse liver measured with 850 nm of excitation wavelength.

ーゲットである。しかしながら実際には、肝組織は小腸組織に比較して蛍光が強いため、CCD検出器で測定できる限界に近い850nm励起でも蛍光を避けることができない。さらに、共存する生体色素による強い共鳴ラマンバンドにより、タンパク質などの非共鳴の弱いバンドは観測することが非常に難しい。

共鳴ラマン効果とは、分子が持つ吸収帯近傍で励起しラマンスペクトルを測定した場合、ラマンスペクトルが数十～数百倍の強度で観測される現象を言う。ヘモグロビン中のヘム色素も同様に強い共鳴効果を示すため、*in vivo*ラマン分光分析の応用は一部の生体組織に限られているのが現状である。動脈硬化プラークのラマン測定では、現在は血管内へラマンプローブを挿入し生理食塩水で置換して測定する手法を想定しているが、被験者へのインパクトを小さくするためには血流中での測定が望ましく、ヘモグロビンのヘム色素が発する強い共鳴スペクトルを除去する手法が必要になる。通常は差スペクトルでの分析が可能であるが、Fig.5のスペクトルのように、色素の影響が非常に強い場合や色素分子を単離して測定できない場合には、差スペクトル法は利用できない。

3. 生体ラマン分光分析のツール上の問題

生体中の組織をラマン分光で分析するためには、無・低侵襲的に目標に到達してレーザーの照射を行い、発生したラマン散乱光を体外に取り出して分析する必要がある。この目的のためには光ファイバーを用いたプローブが最適と思われるが、その開発は容易ではない。光ファイバー中をレーザーが伝搬する際に光ファイバーの素材を励起して、目的試料のラマンシグナルを遙かに上回る強度のラマン散乱光（ノイズ光）を発生するためである。光ファイバーを用いたラマンプローブの構成についてはLewisとGriffithsの総説に詳細に述べられている²⁶⁾。1本の励起光用ファイバーの周りを受光用ファイバーが取り巻く構成が、小さいラマンプローブ作る上で最も有利である。

光ファイバーにもいろいろな種類があり、その選択は

プローブの性能に影響する。WilliamsはFTラマン分光用のラマンプローブを開発し、1064nm励起での光ファイバー素材の影響を比較した²⁸⁾。彼らは、通常の石英ファイバーで製作したプローブは1531cm⁻¹に内在するOH基に帰属される強いバンドを発生するため、低-OHファイバーが材料として最適であることを指摘した。MaとLiは石英のコアを持つファイバーについて、異なる開口数(NA)、コア径がファイバーのラマンバックグラウンド強度に与える影響について調べた²⁹⁾。その結果、測定したファイバー全てでバックグラウンドスペクトル形状は石英のラマンスペクトルによく似ており、NAが大きいほど強度が強くなり、コア径にはあまり関係がないことを指摘した。しかし、彼らが514.5 nm励起で測定したスペクトルには1531cm⁻¹のバンドは観測されていない。ShimとWilsonは通常の石英ファイバーと低-OH石英ファイバーのラマンバックグラウンドスペクトルを785nm励起で測定し、両方で1531cm⁻¹のバンドが観測されないことを示した³⁰⁾。しかし、彼らのスペクトルはMaとLiが測定したスペクトルとも異なり、石英に帰属できるバンドの他に強いバックグラウンドを示している。これらの結果は励起波長変化により光ファイバーのラマンバックグラウンド強度が変化することを示しており、ラマンスペクトルを測定する励起波長を決めた上でプローブの設計をしなければならないことを示唆している。

光ファイバーを束ねて製作したラマンプローブでは、試料が強いラマンシグナルを発する場合は光ファイバーのバックグラウンドスペクトルを引き算してスペクトルを求めることができる²⁷⁾。しかし、高いS/Nのスペクトルを短時間で測定しなければならない生体応用では、プローブにフィルターを施してバックグラウンドを除去する必要がある。最近光ファイバーのバックグラウンドを除去する干渉フィルターを装備した小型のポータブルラマンプローブが市販されている。これらは直径数センチのヘッドを持っており、体表などの観測には使いやすいが体内への応用は無理である。Mahadevan-Jansen等¹³⁾とUtzinger等²⁴⁾はラマンプローブを用い、*in vivo*で頸部の前ガン組織を測定したが、このプローブの直径は12 mmであった。Shim等は1999年に光ファイバーの先端にフィルターを装備した直径1.5 mmのラマンプローブを試作している¹⁸⁾。Motz等は2004年に先端にフィルターとボールレンズを装備した直径2 mmのラマンプローブを開発した³⁰⁾。Buschman等は2000年にVisionex社製の直径1 mmのラマンプローブを用い、羊の血管内のスペクトルを*in vivo*で測定することに初めて成功した⁶⁾。我々の知る限り、発表されたラマンプローブの中では、これが最も細径である。(残念ながら、Visionex社は現在このラマンプローブの販売を行っていないらしい(注)。)しかし実際には、外径750 μmの血管内視鏡が、最も危険な症例のひとつである冠動脈の動脈硬化の診断に使われている。血管内視鏡と同様に患部に達し、測定・診断するためには、ラマンプローブの直径は750 μm以下でなければならない。

(注)：著者(佐藤)は購入の可能性を問い合わせたが、レスポンスがなかった。

Fig.6 A schematic representation of background free (BF) electronically tuned Ti:sapphire laser.

4. 我々の取り組み

以上2, 3項で述べた問題を解決するためには, 以下の能力を持った新しいラマン分光技術や新しい測定ツールを開発する必要がある。

- ①蛍光を回避してラマンスペクトルを測定する技術
- ②ヘモグロビン等の色素による強い共鳴ラマンスペクトルを回避して非共鳴分子種による弱いラマンスペクトルを抽出する技術

- ③直径750 μm 以下のラマンプローブ

以下に我々によるこれらへの取り組みについて述べる。

- ①蛍光を回避してラマンスペクトルを測定する技術

「1.はじめに」項で述べたように, ラマンバンドは絶対波数軸上では($\nu_0 \pm \nu_1$)に観測され, 励起レーザー波長が($\nu_0 + \delta\nu$)にシフトすると($\nu_0 + \delta\nu \pm \nu_1$)に観測される。一方, 蛍光は励起レーザー波長 λ_0 に対して($\nu_f < \nu_0$)の条件で発生し, 励起レーザー波長が($\nu_0 + \delta\nu$)にシフトしても, $\delta\nu$ が十分に小さくまた($\nu_f < \nu_0 + \delta\nu$)が満たされる限りバンド波数や強度は変化しない。この特徴を利用して蛍光とラマン散乱光を分離することができるはずである。しかしこのアイデアを実現しようとする, 装置上の問題が生ずる。すなわち, 一般的なチタンサファイアや色素レーザー等の波長可変レーザーをラマン光源として利用する場合, 波長を変えると光軸やビームの角度が変化して試料上の焦点位置に大きなズレが生じてしまう。さらに, 透過波長の決まったバンドパスフィルターを用いてレーザー媒質から放射される背景放射光を取り除く必要があり, 自由に励起波長を変えてラマンスペクトルを測定することはできない。

以上の問題は電子制御波長可変チタンサファイアレーザー (ETL: Fig.6) を光源に用いることによって解決できる^{31,32)}。ETLは高速に, 正確に, 波長と強度を自由に制御できるレーザーである。特にDual-RF-Driving (DRD) 法で安定化した無背景放射 (BF-) ETLはTable.1に示す特性を持ち, ラマン分光分析の光源として最適である。ほんの僅かではあるが波長変化で生じる光軸ズレは, 光軸に平行に生じるため, レンズで集光して用いるラマン測定では全く問題にならない。従って, Fig.4に

Table.1 Properties of a background less electronically tuned Ti:sapphire laser.

Tunable Range	700~1000nm
Least Interval for Tuning	<10 μs
Instability in Tuning Wavelength	<0.1nm
Instability in Tuning Power	< $\pm 2\%$ /10 Pulses average
Background Emission/Main Laser Power	<10 ⁻¹³
Pointing Stability	<1/10 of Beam diameter

示したように, 励起波長を変化させながら正確にスペクトル強度を比較することも可能である。

蛍光を除去してラマンバンドを観測するひとつの方法として, 通常のCCD検出器を装備したラマン分光器を用いる方法がある。ラマン分光器の検出波長を固定したまま, 励起波長 ν_0 と $\nu_0 + \delta\nu$ で2回測定し, 両者の差を取る手法である。蛍光が相殺され, 微分型となったラマンバンドが残される。(Fig.1 参照) 元のスペクトルを再構成することも可能であるが, そのままケモメトリックス解析を用いて定量分析を行うこともできる。タンパク質溶液にレーザー用蛍光色素を添加した試料を用いて実験した結果, 蛍光強度の100分の1以下のラマンバンドを定量的に観測できた。0~100mg/mLの濃度では0.99の相関を持つ検量モデルを作ることができ, モデルの主成分はタンパク質のバンドを反映していた。蛍光を除去せずに検量モデルを構築した場合, モデルの主成分は全て蛍光バンドを反映したものとなり, 未知試料への適応はできなかった。現在再現性の確認実験を行っており, 近く成果を発表する予定である。

蛍光を除去してラマンバンドを観測するもう一つの方法に, 我々が考案した「スイッチングラマン分光法」がある。励起光は僅かにずらした2波長を周期的にスイッチさせながら波長掃引する。検出には掃引する波長より長い透過波長を持つバンドパスフィルターを用い, 光電子増倍管等のシングルチャンネル検出器を用いる。検出器からのシグナルはロックインアンプに導かれ, スwitching周期に合わせて差分増幅する。スイッチングラマン分光法の原理的な性能はロックインアンプのダイナミックレンジ値によって決まり, 一般的な70~100dBの性能を持つロックインアンプでの蛍光除去能力は1/3,000~1/100,000 (ラマン強度/蛍光強度) となる。現在, 我々の研究室で装置の開発が進められている。

- ②ヘモグロビン等の色素による強い共鳴ラマンスペクトルを回避して非共鳴分子種による弱いラマンスペクトルを抽出する技術

例えば, 様々な生体色素分子を内包している肝・脾臓

Fig.7 Raman spectra of oxy-hemoglobin in a water solution measured with 690-860 nm (increment of 10 nm) of excitation wavelengths. Sequence of the spectra is in order of the increment of the excitation wavelength from the top (690 nm) to the bottom one (860 nm). (Ref. 35) Bands with numbers circled by solid lines are assigned to heme chromophoric groups and that circled by dotted lines are assigned to apo-protein groups.

等では、Fig.5 に示したように生体色素分子が強いラマン共鳴効果を示し、共存する非共鳴分子種であるタンパク質組織のスペクトル測定が困難になる場合がある。生体色素の種類が限られている血管などの臓器では、前もって生体色素を単体で測定して、差分法で分析することが可能であるが、生体色素の合成・分解を行う臓器では多様な中間生成物が存在するため、全ての分子のラマンスペクトルを前もって測定することは不可能である。従って、共鳴・非共鳴分子種のスペクトル情報を分離する技術が必要となる。

蛍光に比較して共鳴ラマンバンドの回避は原理的に非常に難しい。共鳴効果は特定の分子の吸収帯に励起レーザーが共鳴して発生し、両者が重なっている時を(真性)共鳴、重なっていない時を前期共鳴と呼ぶ。ヘモグロビン中のヘムは、550nm付近に極大を持つQバンド吸収帯に対してNIR-ラマン分光法で用いる700~860nmの波長領域を遙かに超え、Qバンドの裾野にもかからない1064nmの励起光で前期共鳴スペクトルを与えることが知られている³³⁾。共鳴による増強効果が励起波長によりどのように変化するかは、Albrechtによって詳しく計算されているが³⁴⁾、一般的には吸収波長から励起波長が遠ざかるにつれ増強効果も減少すると考えられる。

Fig.7 には励起波長680~860nmで測定したoxy-ヘモグロビンのラマンスペクトルを示す³⁵⁾。水のスペクトルを引き算し、レーザー強度、分光器およびCCDの検出特性、 λ^4 則に対する校正を行ってある。680nm励起のスペ

クトルが最も強く一番上に、860nm励起のスペクトルが最も下に配置し、あたかも励起波長の増加に従って段差を付けて表示したかのようにきれいに配列した。これはラマンスペクトルの背景となっている蛍光が、励起波長が長くなるに従って減少しているからである。1642, 1623, 1605, 1585, 1567, 1553, 1224, 750 cm^{-1} のバンドはヘム色素に帰属される。1450, 1000 cm^{-1} のバンドはアポタンパクであるグロビンタンパクに帰属できるが、ヘムの強い寄与を含んでいると考えられる³⁵⁾。Fig.7 中のスペクトルは、前期共鳴しているヘム色素と非共鳴のグロビンタンパクのスペクトルの重ね合わせであると考えられる。従って、グロビンタンパクのバンドを抽出できれば、生体組織中の非共鳴分子種のスペクトルも抽出できることが示唆される。

さて、我々はこの目的のために、励起波長変化に対して変化する共鳴分子種と変化しない非共鳴分子種のスペクトルを、ケモメトリックスの一種である最小二乗回帰分析(PLS)を用いて分離する手法の開発を試みている³⁵⁾。長谷川は主成分回帰分析(PCA)を用いて、ショ糖濃度変化に対するAlkyl-deuterated dipalmitoylphosphatidylcholineのラングミュア-プロジェクト膜の赤外スペクトル変化を分析し、微小成分である界面水分子の情報を抽出できることを示しており^{36,37)}、同様の効果が期待できる。しかし、Fig.7の一連のスペクトルから蛍光のベースラインを引きそのままPCA解析すると、第1~4主成分までのローディングウェイトには全てヘムの寄与だけが現れ、変化しないタンパク質に帰属できる1450と1000 cm^{-1} のバンドはほとんど消えてしまう。³⁵⁾ 回帰分析の過程で変化しないスペクトル成分は消えてしまうため、非共鳴分子のスペクトルを抽出するためには強度に変化を与える必要がある。ここで、励起波長 n ($680 \leq n \leq 860$)で測定したスペクトルを s_n 、 s_n 中のラマンシフト m ($800 \leq m \leq 1800$; cm^{-1})の強度を $s_{n,m}$ と表示し、定数 c_n を各スペクトルに掛け合わせる。(式(1))このとき強度調整後のスペクトル S_n 中の $S_{n,1567}$ が一定となるように c_n を調整する。(式(2))

$$S_{680}\{S_{680,800}, S_{680,801}, \dots, S_{680,1567}, \dots, S_{680,1799}, S_{680,1800}\} = S_{680}\{S_{680,800}, S_{680,801}, \dots, S_{680,1800}\} \times C_{680}$$

$$S_{690}\{S_{690,800}, S_{690,801}, \dots, S_{690,1567}, \dots, S_{690,1799}, S_{690,1800}\} = S_{690}\{S_{690,800}, S_{690,801}, \dots, S_{690,1800}\} \times C_{690}$$

⋮

$$S_{860}\{S_{860,800}, S_{860,801}, \dots, S_{860,1567}, \dots, S_{860,1799}, S_{860,1800}\} = S_{860}\{S_{860,800}, S_{860,801}, \dots, S_{860,1800}\} \times C_{860} \dots \dots \dots (1)$$

$$S_{n,1567} = s_{n,1567} \times c_n = \text{const.} \dots \dots \dots (2)$$

1567 cm^{-1} にはヘムの骨格振動に帰属できるバンドが観測され、タンパク質はこの領域に強いバンドを持っていない。ここで、 c_n を説明変数として S_n をPLS分析すると、 c_n と強い相関を持って変化するバンドが主成分として抽出されるはずである。

Fig.8 The first (a), second (b) and third (c) PLS loading weights for the series of Raman spectra of oxy-hemoglobin. (Ref. 35)

Fig.8にPLSモデルの第1～3主成分のローディングウェイト(a)～(c)を示す³⁵⁾。第1主成分に見られる1660, 1452, 1224, 1210, 1002 cm⁻¹のバンド成分はそれぞれタンパク質のアミドI, CH₂変角振動, アミドIII(2バンド), フェニルアラニンのベンゼン環の伸縮振動に帰属できる。前述したように1224 cm⁻¹にはヘムに帰属される強いバンドが重なって観測されていたが, 第1主成分に観測されるバンドは小さく, ヘムの寄与が消えタンパクのアミドIIIモードの寄与だけが残されていることが示唆される。残念ながら, グロビタンパクのスペクトルだけを反映した主成分は分離できなかったが, 興味あることに, 第1主成分上で消滅したヘムの1642, 1567, 1224 cm⁻¹のバンドは, 全てB_{1g}と呼ばれる振動モードグループに属しており, 消滅せずに残った1623, 1607, 1586 cm⁻¹等はA_{1g}やA_{2g}の振動モードグループに属していることが示唆された³⁵⁾。これは, 共鳴による増強効果が振動モードグループ毎に異なるというおもしろい知見を与えており, この結果を考慮した分析法を開発し, 強い共鳴スペクトルを回避して非共鳴分子種のラマンスペクトルを抽出する性能を上げていく予定である。

③直径750 μm以下のラマンプローブ

ラマンプローブの開発上, 光ファイバーの発するラマンバックグラウンドの除去が最も大きな問題である。我々は外径750 μm以下で血管内視鏡に搭載できるラマンプローブ開発を目指している。プローブの励起波長は, 脂質のCH₂伸縮振動を含む3000～500 cm⁻¹を観測するた

めに720 nmを, 1800 cm⁻¹以下を重点的に測定するために785 nmを選択した。光ファイバーの選択には従来の報告より高い精度でラマンバックグラウンド強度を測定できる方式を採用した結果, MaとLiによる結果と異なり, NAが小さく, コア径が小さいほどラマンバックグラウンド強度が小さいことを明らかにした。この結果, 先発のグループがコア径300 μm(受光)と400 μm(励起)の光ファイバーを用いてラマンプローブを製作したのに対し¹⁸⁾, 我々は内径114 μm, 外径125 μmの光ファイバーを用いることができた。細径化の結果, プローブの先端にフィルターを装着するための新たな技術の開発が必要となった。特別に蒸着したハードコート干渉フィルターを用い, 直径数百マイクロメートルでの切削加工が可能な技術を開発した。これにより, 高いフィルター性能を保持したまま光ファイバーの先端へ装着することが可能になった。現在試作したラマンプローブの外径は600 μmであり, 我々が知る限り最も細径である。開発の成果は現在投稿中である。さらに高感度化を目指した先端部へのレンズ装着や, 側視型の開発を行っている。

5. まとめ

ラマン分光分析の生体応用研究はようやく, これまでのin vitro研究から動脈硬化症診断を初めとした無・低侵襲のin vivo, in situ研究へと踏み出そうとしている。もちろん, 皮膚や眼など表出組織への応用は古くからあるが, 超小型ラマンプローブの開発によりその応用範囲は消化器官や血管を通して大きく広がるはずである。現時点では, 生体内でラマン測定ができる実用的なプローブを持っているのは, 我々の知る限り世界で3グループだけであるが^{18,24,30)}, 我々の開発したプローブを様々な研究に応用してくれる研究者が増えることを願っている。生体中では無・低侵襲が求められ, 蛍光や血流, 生体色素の問題を物理的に取り除くことはできないが, 新しい分光技術で対応できる見通しが付いた。今後はこれら技術の実用化, 装置化が重要な課題である。

参考文献

- 1) H. A. Crispin and A. F. Van Baarle: Intravascular observation and surgery using the flexible fiberscope, *The Lancet* 1: 750-751, 1973.
- 2) M. Takano, K. Mizuno, S. Yokoyama, K. Seimiya, et al.: Changes in coronary plaque color and morphology by lipid-lowering therapy with atorvastatin: Serial evaluation by coronary angiography, *J. Am. College Cardiology* 42: 680-686, 2003.
- 3) P. リビー: 動脈硬化が怖い本当の理由, *日経サイエンス*, 8: 46-55, 2002.
- 4) B. Schrader, B. Dippel, I. Erb, S. Keller, et al.: *J. Mol. Struct.*, 480-481: 21-32, 1999.
- 5) R. Manoharan, J. J. Baraga, M. S. Feld and R. P. Rava: Quantitative histochemical analysis of human artery using Raman spectroscopy, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 16: 211, 1992.
- 6) H. P. Buschman, E. T. Marple, M. L. Wach, B. Bennett, et al.: In vivo determination of the molecular composition of artery wall by intravascular Raman spectroscopy, *Anal. Chem.* 72: 3771-3775, 2000.

- 7) E. B. Hanlon, R. Manoharan, T.-W. Koo, K. E. Shafer, et al.: *Phys. Med. Biol.* 45: R1-R59, 2000.
- 8) Y. Ozaki, A. Mizuno, H. Sato, K. Kawauchi, et al.: *Appl. Spectrosc.* 46: 533, 1992.
- 9) B. Venkatesh, S. Ramasamy, M. Mylrajan, R. Asokan, et al.: *Spectrochim. Acta A*, 55: 1691, 1999.
- 10) B. Schrader, B. Dippel, I. Erb, S. Keller, et al.: *J. Mol. Struct.* 480-481: 21, 1999.
- 11) C. J. Frank and R. L. McCreery: *Anal. Chem.*, 67: 777, 1995.
- 12) J. F. Brennan III, Y. Wang, R. R. Dasari and S. Feld: *Appl. Spectrosc.* 51: 201, 1997.
- 13) Mahadevan-Jansen, M. F. Mitchell, N. Ramanujam, A. Malpica, et al.: *Photochem. Photobiol.* 68: 123, 1998.
- 14) P. J. Caspers, G. W. Lucassen, R. Wolthuis, H. A. Bruining, et al.: *Biospectroscopy*, 4: S31, 1998.
- 15) T. J. Romer, J. F. Brennan III, T. C. Bakker Schut, R. Wolthuis, et al.: *Atherosclerosis*, 141: 117, 1998.
- 16) J. Berger, T.-W. Koo, I. Itzkan, G. Horowitz, et al.: *Appl. Optics*, 38: 2916, 1999.
- 17) J. Y. Qu, B. C. Wilson and D. Suria: *Appl. Optics*, 38: 5491, 1999.
- 18) M. G. Shim, B. C. Wilson, E. Marple and M. Wach: *Study of Fiber-optic probes for in vivo medical Raman spectroscopy*, *Appl. Spectrosc.* 53: 619-627, 1999.
- 19) T. J. Romer, J. F. Brennan III, G. J. Puppels, A. H. Zwinderman, et al.: *Atheroscler Thromb. Vasc. Biol.* 20: 478, 2000.
- 20) P. J. Caspers, G. W. Lucassen, E. A. Carter, H. A. Bruining, et al.: *J. Investigative. Der-matology*, 116: 434, 2001.
- 21) R. Wolthuis, M. van Aken, K. Fountas, J. S. Robinson, Jr., et al.: *Anal. Chem.*, 73: 3915, 2001.
- 22) S. W. E. van de Poll, T. J. Romwe, O. L. Volger, D. J. M. Delsing, et al.: *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 1630, 2001.
- 23) H. Sato, H. Chiba, H. Tashiro and Y. Ozaki: *J. Biomed. Opt.*, 6: 366, 2001.
- 24) U. Utzinger, D. L. Heintzelman, A. Mahadevan-Jansen, A. Malpica, et al.: *Near-infrared Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical precancers*, *Appl. Spectrosc.*, 55: 955-959, 2001.
- 25) S. Keller, B. Schrader, A. Hoffmann, W. Schrader, et al.: *J. Raman spectrosc.*, 25: 663, 1994.
- 26) H. Sato, H. Chiba, H. Tashiro and Y. Ozaki: *J. Biomed. Opt.* 6: 366, 2001.
- 27) I. R. Lewis and P. R. Griffiths: *Raman spectrometry with fiber-optic sampling*, *Appl. Spectrosc.* 50: 12A, 1996.
- 28) K. P. J. Williams: *Remote sampling using a fiber-optic probe in Fourier transform Raman spectroscopy*, *J. Raman. Spectrosc.* 21: 147-151, 1989.
- 29) J. Ma and Y.-S. Li: *Fiber Raman background study and its application in setting up optical fiber Raman probes*, *Appl. Opt.*, 35: 2527-2533, 1996.
- 30) J. T. Motz, M. Hunter, L. H. Galindo, J. A. Gardecki, et al.: *Optical fiber probe for bio-medical Raman spectroscopy*, *Appl. Opt.*, 43: 542-554, 2004.
- 31) H. Sato, S. Wada and H. Tashiro: *Fluorescence background less Ti:sapphire laser using acoust-optical tunable filter for Raman spectroscopic measurements*, *Appl. Spectrosc.*, 56: 1303-1307, 2002.
- 32) H. Sato, S. Wada, M. Ling and H. Tashiro: *Noninvasive measurement of near-infrared transmission spectra of a whole human hand with an electronically tuned Ti:sapphire laser operated by dual radio frequency driving method*, *Appl. Spectrosc.*, 54: 1163-1167, 2000.
- 33) Y. Ozaki, A. Mizuno, H. Sato, K. Kawauchi, et al.: *Biomedical application of near-infrared Fourier transform Raman spectroscopy. Part I: the 1064-nm excited Raman spectra of blood and met hemoglobin*, *Appl. Spectrosc.* 46: 533-536, 1992.
- 34) A. C. Albrecht: *J. Chem. Phys.* 34, 1476, 1961.
- 35) H. Sato, S. Wada, Y. Ozaki and H. Tashiro: *Qualitative analysis of trace Raman bands of non-resonant species in near-infrared excited pre-resonance Raman spectra of hemoglobin by partial least square regression-Raman excitation profile method*, *Vibrational Spectrosc.* 34: 149-156, 2004.
- 36) T. Hasegawa: *Anal. Chem.* 71: 3085, 1999.
- 37) T. Hasegawa: *Anal. Bioanal. Chem.* 375: 18, 2003.

著者紹介

佐藤 英俊

Hidetoshi Sato

ケンタッキー州レイビル大学医学部客員研究員 (1993年)。1997年関西学院大学大学院 (博士 (理学)) 修了。理化学研究所基礎科学特別研究員 (1997-2001年)、協力研究員 (2001-2003年) を経て、現在同研究所研究員 (2003年-)。『電子制御波長可変レーザーの生体分析技術の開発』、『血管内視鏡用マイクロラマンプローブの開発』等の研究に従事。