日本における医用分光学の進展

山本 達之^{1,2}, ヘマンス・ヌータラパティ¹, 岩崎 啓太²

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

²鳥取大学大学院 連合農学研究科 (〒680-8553 鳥取市湖山町南4丁目101)

The Development of Medical Spectroscopy in Japan

Tatsuyuki YAMAMOTO,¹ Hemanth NOOTHALAPATI,¹ and Keita IWASAKI²

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue 690-8504

²The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, 4-101 Koyama-cho, Tottori 680-8553

(Received July 31, 2018)

In this review, historical background along with some important studies that led to the development of medical spectroscopy in Japan has been introduced. Great interest among researchers for medical applications of spectroscopy began with the development of Laser Raman spectroscopy which was then followed by the progression of FT-IR spectroscopy. Medical spectroscopy field took a quantum leap when spectrophotometers were combined with microscopes which enabled researchers to investigate at sub-cellular resolutions and acquire large number of spectra. This resulted in rapid development of suitable chemometric approaches. Some recent examples on medical applications of Raman spectroscopy and some routinely used chemometric methods such as SVD, PCA and MCR-ALS have been discussed.

Key Words: Medical Spectroscopy, Raman Spectroscopy

1. はじめに

現在、筆者は、医用分光学会 (<http://www.medical-spectroscopy.jp/>) という研究者の集まりを代表していて、分光学の医学応用研究の進展と普及を図っている。この研究会は、2004年に、濱口 宏夫東京大学教授(当時)によって始められた会で、筆者は4代目の会長である。医用分光学の進展を紹介するに当たって、これまでの医用分光学の歩み、そしてこの研究会設立当時の状況について概観し、その後の医用分光学の進むべき方向について記してみようと思う。本稿の後半では、私たちが行っている医用分光学に関する研究例を紹介しつつ、医用分光学の普及にとって、必要不可欠なスペクトルの解析手法について紹介する。筆者は、分子分光学の中でも振動分光学を専門としているため、本稿の内容もそうした観点から見た研究が中心となることを、最初にお断りしておく。

2. 医用分光学とは何か？

そもそも、医用分光学とはなんだろうか。分光学の医学応用という意味であろうが、医学事典などを見ても載っていない。英語で書けば、Medical Spectroscopyとい

うことになるが、医用分光学の普及を目指す立場から言わせていただくと、医用分光学とは、分光学の臨床診断技術応用を意味する。ガン診断、種々の炎症の診断などに関する臨床応用研究が、その中心である。国際的には、この分野には、近年医療従事者が多く参入しつつあるし、そこでは、常に「臨床」、つまり“Clinical Applications”が強く意識されている。ヨーロッパを中心に活動しているSPEC(International Society of Clinical Spectroscopy)などでは、学会に多くの医学博士が参加している。SPECについては、本書の別稿で佐藤英俊教授による詳しい紹介があるのでそちらに譲るが、今後我が国においても、分光学的手法を、医療従事者から臨床ツールとして、もっと認識してもらう必要がある。医用分光学会の目指しているのも、正にその点にある。

3. 我が国における医用分光学の歩み

医用分光学が発展する基礎となった生体分子に関する研究は、基本的に均一系を対象とし、分子分光学を専門とする物理化学を基盤とする研究者が行ってきた。レーザー共鳴ラマン分光法が急速に発展した1970年代以降、生体分子に関する分光学的研究が数多く行われた。例えば、ヘモグロビン分子への酸素結合に伴う構造変化な

ど、生体分子の構造と機能の関連について理解が急速に進んだ。当時の雰囲気伝える文章として、1980年に書かれた「ラマン分光と生体」という記事がある¹⁾。その記事は、以下のように結ばれている。「以上述べたように、ラマン分光法はいろいろな生体そのものの構造と、機能の関連性を研究するための特色ある手段となりつつある。中略 ラマン分光法が生体物質の研究にも有用であることはいうまでもなく、研究の数のうえからも生体物質を対象としたものの方が、生体そのものを対象としたものよりもはるかに多い。以下略」。分光学の生体応用研究の対象の多くが、均一系の生体分子であったことが分かる。生体組織そのものは、ほとんど研究の対象とはならなかった。

1980年代になると、FT-IRの普及に伴って、赤外吸収分光法による生体分子への応用研究が進んだ。この頃になると、生体組織そのものを対象とした研究が、数は少なくとも進展しつつあった。尾崎幸洋教授による、総説²⁾や教科書³⁾が詳しいので、そちらに譲るが、尾崎らとNai-Teng Yuらの独立した二つのグループによって明らかになった、眼の水晶体の白内障発症の分子機構に関するラマン分光法による研究が代表的である。彼らは、水晶体ゲルを構成するクリスタリンと呼ばれるタンパク質のシステイン残基のS-H側鎖が、加齢による酸化に伴って、分子間架橋(ジスルフィド結合)を形成して、白内障が引き起こされることを、ラマン分光法によって突き止めた⁴⁾(Fig. 1, 文献2より改変して転載)。

Fig. 1は、ウサギの水晶体のラマンスペクトルである。尾崎らは、加齢に伴って、水晶体に含まれる水のバンド(3280~3390 cm^{-1})のタンパク質のバンド(1004 cm^{-1})に対する強度比が著しく減少することや、システイン残基のS-H伸縮振動のバンド(2579 cm^{-1})強度が減少し、シスチンのSS伸縮振動(509 cm^{-1})が新たに現れることなどを示した。これらの研究によって、ジスルフィド結合形成によって引き起こされるクリスタリング内部の部分的な凝集が不可逆的に進行し、水晶体内部の屈折率に不均一性が生じることが分かった。これにより、加齢に伴って白内障が発症する分子機構が明確になった。これらの研究が対象としたのは、クリスタリングという比較的均一な系であったが、すでに医用分光学を強く意識した研究であったと言える。この頃は、人工レンズによる白

Fig. 1 Raman spectra of core of rabbit lens (488 nm excitation, laser power 120 mW, slit 7 cm^{-1} , time constant 4 s, scan speed 25 $\text{cm}^{-1}/\text{min}$) Top: one month old, Bottom: five years old

内障治療方法は確立しておらず、白内障の早期診断方法の確立と予防は重要な医学的テーマであった。

1990年代以降になると、顕微鏡と組み合わせた、顕微分光装置が登場し、生体組織のような不均一系に関する本格的な研究が可能となった。そして、空間分解能の差から、研究の中心は、赤外吸収分光法からラマン分光法に再び移ってきた。冒頭で述べたように、濱口教授が、医用分光学研究会の設立の必要を感じたのが、この頃にあたる。分光学的手法が、医療従事者にとって当然のツールとなるためには、分光学の有用性を理解してもらい、医療従事者が数多くこの分野に参入することが不可欠である、しかし、それには大きな障害があった。

医用分光学の研究対象の多くは、不均一系である。従って、例えば、生体組織のラマンスペクトルを測定することが可能であったとしても、測定の実現性の低さ、得られたスペクトルデータの解析の困難さ、ラマン分光測定の大敵である蛍光による妨害など、多くの障害がある。更に問題なのは、測定されるスペクトルは、種々の分子に由来するラマンスペクトルが、異なる強度比で重なり合っているため、解析が困難なことである。このため、医用分光学的研究に挑戦しようとする医療従事者は、ほとんどいない状況であった。

そこで、濱口教授は、スペクトルの持っている分子情報を読み解くことができる、分光学の専門家と、医療診断に詳しい医学の専門家の共同研究を進めた。この動きが、医用分光学研究会の立ち上げに繋がった。その頃の研究の代表として、筆者は、肺がん組織のラマン分光法による診断に関する研究を紹介する⁵⁾。

がん組織は、代表的な不均一系である。そこには、細胞周期の異なる種々の正常細胞及びがん細胞や、結合組織などが混在している。こうした系では、しばしば強い蛍光が大きな問題になる。蛍光を出しにくい、比較的長波長の近赤外レーザーとして、785 nm励起の測定がよく行われるが、この研究が対象にした系である肺がん組織は、785 nm励起でも強い蛍光を与えた。そこで、濱口らは、Nd:YAGレーザーの基本波である1064 nm励起によるラマン測定を行った。その結果、良好なラマンスペクトルを得ることに成功した。Fig. 2は、その結果を示している。図の左側には、患者が切り取られた肺がん組織の写真を、右側には、各々の番号で表される場所で測定された、ラマンスペクトルを示している。がん組織は、タンパク質の特性バンドであるアミドIが強く現れるのに対して、正常組織では、アミドIバンド強度が弱いことが分かる。図の測定点1は、正常組織の平均ラマンスペクトルに酷似し、測定点2~7は、がん組織の平均ラマンスペクトルに酷似していることが分かる。これらの結果から、彼らは、アミドIバンド強度を基準に、肺がん組織の診断が可能であることを示した。

こうして始まった医用分光学研究会の活動は、様々な分光学的手法を積極的に医療現場に持ち込み、一般社会に浸透する技術として活用することを目指している。濱口会長の後の会長は、甲田英一先生(東邦大学医療センター教授(当時))、鈴木榮一郎先生(味の素株式会社イ

Fig. 2 Left: Lung tissue, Right: Raman spectra of lung tissue. Numbers 1-7 indicate corresponding position from where Raman spectrum was measured.

ノベーション研究所(当時))が順に務められ、4代目の私に至っている。研究会には、医学者だけでなく生体組織を扱う企業や分光器メーカーなども加わっており、医用分光学に関する研究の進展を図っている。最近の応用研究例などについては、教科書を参照していただきたい⁶⁾。

4. 医用分光学の普及に必要なもの —解析手法—

ラマン分光法などの医用分光学的手法は、低侵襲であるためであるため、生検やその後の組織染色などを必要とする既存の診断法と比較して、患者負担の軽減が可能である。このため、医療診断応用の期待が高まっている。実際、医用分光学に関連した研究は活発化している。しかし、本当の意味で医用分光学が普及するためには、医療従事者が日常的に分光学を診断に用いることが可能にならなければならない。このために最も重要な課題は、スペクトル解析の自動化や、スペクトル測定の再現性の確保であると思われる。内視鏡に組み込み可能なプローブの開発も進んでいるが、測定したスペクトルから、一目で診断可能なソフトなどの発展が不可欠である。

すなわち、医用分光学の普及のために必要なのは、測定されるスペクトルデータなどのリアルタイム自動解析であると思われる。そこで、本稿の後半では、我々が日常的に用いている、多変量解析法の原理について簡単に紹介し、解析手法の発展の重要性について述べる。

繰り返しになるが、生体組織は不均一系である。蛍光による妨害も多い。生体組織を測定して得られるラマンスペクトルの実体は、測定点に存在する全ての物質のラマンスペクトルの重畳である。従って、単純なラマン測定によって医療診断が可能になるのは、ある疾患の原因あるいはマーカーとなる物質のラマンバンドを簡単に測定できる場合に限られる。

しかし、これでは応用可能性が限定的になるので、重畳している種々の物質由来のラマンスペクトルから、幾

Fig. 3 Top: Four principal components of human breast cells (HMEpC; normal cell and MCF7; cancer cell) decomposed by PCA method (Loadings Plot), Bottom: Two-dimensional Scores plot for principal component-1 against principal component-2.

つかの主要成分を分離して、それらの強度について議論することがしばしば行われる。主成分分析法(Principal Component Analysis: PCA)などが有名である。PCA解析法とは、行列を用いた直交回転操作を行って、変数間の相関を無くした、主成分と呼ばれるベクトルと、そのベクトルへの測定スペクトルの射影を示すスコアに変換する手法のことである。

例として、我々が乳がん細胞と正常細胞のラマンスペクトルを、PCAによって解析した例を示す。

ヒト乳がん細胞(MCF7)と正常細胞(HMEpC)各30個から、各細胞当たり5か所のラマンスペクトルを得た(山本ら、未発表データ)。PCA解析の結果、4つの主値(PC-1~4)が得られた(Fig. 3上)。PCA解析で得られるスペクトルは、微分形のバンドや、負の値を持つため、これらのスペクトルは、ラマンスペクトルそのものを表している訳でない。しかし、各成分の主成分スコアを、各々X軸とY軸にとって、測定データをプロットするとことで、測定されたスペクトルの相関を視覚的に比較可能となる。(Fig. 3下、破線の位置で両者を区別できる)。この図で示したのは、PC-1とPC-2に対する2次元スコアプロットであるが、これ以外にPC-1~4の全ての組み合わせに対して、同様のプロットを得ることができる。この

ようにPCAによって、がん細胞と正常細胞を統計的に区別することが可能であるが、この解析によって得られる主値(スペクトル)は、先に述べたように、ラマンスペクトルそのものではない点に注意が必要である。

これに対して、我々は、非負拘束マルチバリエイト法(Multiple curve resolution-alternating least-square: MCR-ALS)という解析手法を主に用いている。MCR-ALS法とは、多数の測定点で得られたラマンスペクトルを、ベクトル量と捉え、幾つかの独立したラマンスペクトル成分が測定点毎に異なる強度比で重なり合っていると解釈する手法である。詳細は、参考文献⁷⁻⁹⁾に譲るが、MCR-ALS法では、独立したラマンスペクトル成分と、それらの測定点毎の強度を行列計算によって得る解析手法である。非負拘束という条件が付いているのは、ラマンスペクトルは負の値を取ることが無いので、行列計算の際に、行列計算によって得られる独立したラマンスペクトル成分に、負の値を取らないという条件を付与して行うためである。

実際にMCR-ALS解析を行う際には、予め独立したラマンスペクトル成分の推定を行う。先述のPCAや特異値分解(SVD)によって得られる成分と、場合によっては経験的な推定と合わせて、独立成分数を決定する。信号雑音比(S/N)が悪いデータを扱う際は、SVD操作によって、特異値が低い成分をラマンスペクトル成分が含まれない成分とみなし、ノイズ除去を行う場合がある。

次に、非負拘束条件の下で、実測されたラマンスペクトルと、計算された独立したラマンスペクトルの間の残差が最少になるように収束させる。このようにして得られた、独立したラマンスペクトル成分は、通常のPCAによって得られた主成分とは異なり、物理的に意味を持っている。このため、標準試料とMCR-ALS法によって計算された独立したラマンスペクトル成分を比較することによって、測定点に存在する物質を構成する分子とその

Fig. 4 Decomposed Raman spectral components of oral cancer tissues by NMF method(a~f). Raman spectrum of standard sample of α -keratin (g).

相対的な存在量を推定することが可能となる。

口腔がんの組織のラマンスペクトルに、MCR-ALS法を適用した研究例を紹介する¹⁰⁾。

Fig. 4のa~fは、口腔がん患者のがん組織のラマンスペクトルの多数データに対して、MCR-ALS法を適用して得られた独立したラマンスペクトル成分である。全てのスペクトルが、正の値のみを持ち、一見してこれらが何かの分子のラマンスペクトルを表していることが示唆される。ただし、MCR-ALS法では、異なる分子の空間分布が似通っている場合は、それらの区別が原理的にできないため、a~fの独立したスペクトル成分が、複数のラマンスペクトルの重なりである可能性は残る。しかし注目すべきは、bのスペクトル成分が、 α -ケラチンの標準スペクトル(Fig. 4のg)に酷似している点である。

同様に、MCR-ALS法を正常細胞のラマンスペクトルに適用しても、bに相当する成分は観測されなかったことから、著者らは、口腔がんの診断を、 α -ケラチンの有無によって診断できる可能性を示した。

ただし、「酷似している」というのは、あくまでも観測者の主観であるため、スペクトルの相似性を客観的に表す指標が必要である。そこで、著者らは、UNED(Unit Normalized Euclidean Distance)法と呼ばれる手法によって、bの成分と α -ケラチンの標準サンプルのスペクトル(g)の比較を試みた。UNED法とは、規格化された二つのスペクトル成分をベクトルとみなし、それらのベクトルの円周上での距離を表す指標を計算する方法である(Fig. 5)。

著者らは、UNED法によって、がん細胞と正常細胞のラマンスペクトルを比較した結果、UNEDの適切な値を閾値に設定することによって、がん細胞と正常細胞を、高い精度で客観的に区別できること示した。このように、MCR-ALS法を用いることによって、特定の分子に帰属可能な独立したラマンスペクトル成分を抽出できる可能性がある。それらのラマンスペクトル成分の強度を色調変調した、ラマンイメージは、今日一般的に用いられるようになってきている。

Fig. 5 Schematic drawing for UNED analysis, vector S is for "Standard Sample" and W for a decomposed spectrum by NMF method.

5. おわりに

ー医用分光学が進むべき方向ー

今後の医用分光学は、ラマン分光法のように、患者負担の小さな低侵襲手法を用いた手法が主流になると予想される。医用分光学的手法が、臨床現場で日常的に用いられるためには、プローブなどを用いた測定の簡便さと、測定データの自動解析可能であることの両方が必要であろう。内視鏡に組み込み可能な、小型ラマンプローブを用いた装置は、佐藤英俊教授らが、すでに高い技術を有している¹¹⁾が、測定データの自動解析については、今後の更なる進歩が必須である。今回紹介したMCR-ALS法に関しても、独立成分数の決定の段階で、未だに任意性が残っている。従って今後は、MCR-ALS法の洗練とUNED法などによる客観的に判別指標の発展が必須であると思われる。今後の、医用分光学の更なる発展を祈念して、本稿を終えようと思う。

参考文献

- 1) 田隅 三生：化学の領域 **34** (1980) 14.
- 2) Y. Ozaki: Appl. Spectrosc. Review **24** (1988) 259.
- 3) 尾崎 幸洋：臨床医学(濱口 宏夫, 平川 暁子編)(学会出版センター, 1988) 4.4章.
- 4) Y. Ozaki, A. Mizuno, K. Itoh, and K. Iriyama: J. Biol. Chem. **262** (1987) 15545.
- 5) Y.-K. Min, T. Yamamoto, E. Kohda, T. Ito, and H. Hamaguchi: J. Raman Spectrosc. **36** (2005) 73.
- 6) 山本 達之：生命科学分野(濱口 宏夫, 岩田 耕一編)(講談社サイエンティフィク, 2015) 4.2章.
- 7) M. Ando and H. Hamaguchi: J. Biomed. Optics **19** (2014) 011016.
- 8) D.-D. Lee, H.-S. Seung: Nature **401** (1999) 788.
- 9) H. Noolthapati, K. Iwasaki, and T. Yamamoto: Anal. Sci. **33** (2017) 15.
- 10) P.-H. Chen, R. Shimada, S. Yabumoto, H. Okajima, M. Ando, C.-T. Chang, L.-T. Lee, Y.-K. Wong, A. Chiou, and H. Hamaguchi: Scientific Reports **6** (2016) 20097.
- 11) A. Taketani, B. B. Andriana, H. Matsuyoshi, and H. Sato: Analyst **142** (2017) 3680.