

<特集「光学顕微鏡法 -その歴史と展望-」>

## ラマン顕微鏡法

原 田 義 規\*

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学

### Raman Microscopy

Yoshinori Harada

*Department of Pathology and Cell Regulation,  
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

### 抄 録

光が分子に散乱される場合、その大部分は入射光と同じ振動数を持つレイリー散乱光であるが、わずかに入射光と振動数が異なる散乱光が観察される。これがラマン散乱光である。ラマン散乱光は、生体分子の分子振動に依存して波数シフトが見られ、波数シフトを分析することにより、生体に含まれる分子の解析が可能となる。ラマン顕微鏡は可視光～近赤外光を光源として用いることができるため、水分子の影響を受けにくく、非標識・非破壊的に生体組織を解析しうる。本稿では、ラマン顕微鏡の原理と医学・病理学への応用について自験例を中心に解説する。

キーワード：ラマン顕微鏡, ラマン散乱光, 生体組織.

### Abstract

When light is scattered by molecules, the majority is Rayleigh scattered light having the same frequency as the incident light. However, scattered light slightly different in frequency from the incident light is also observed. This is Raman scattering light. A wavenumber shift is observed in the Raman scattered light depending on the molecular vibration of the molecules in cells and tissues. It is possible to obtain information on molecules contained in the living tissues by analyzing the wavenumber shift. Since the Raman microscopy can use visible light to near infrared light as a light source, it is hardly affected by water absorption, and unlabeled and nondestructive analysis on living tissues is feasible. In this paper, we discuss the principle of Raman microscopy and its possible application to medicine and pathology based on our findings.

**Key Words:** Raman microscopy, Raman scattering light, Living tissue.

光が分子に散乱される場合、大部分は入射光と同じ波長を持つレイリー散乱光（光と分子の間でエネルギー移動がない）である。しかし、わずかに入射光と波長が異なる散乱光（光エネルギー

---

平成29年11月10日受付 平成29年11月10日受理

\*連絡先 原田義規 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路ル梶井町465番地  
yoharada@koto.kpu-m.ac.jp

ギーの一部が分子に移動)が観察される。これがラマン散乱光である(図1)<sup>1)2)</sup>。ラマン散乱光は、1928年に Sir Chandrasekhara Venkata Raman により初めて観察され、CV Raman は1930年にノーベル物理学賞を受賞している。

ラマン散乱光は、生体分子の分子振動に依存して励起波長から波数がシフトする。波数とは単位長当たり波が幾つ含まれるかを表す数であり、波長 $\lambda$ であるなら、波数 $k=1/\lambda$ である。振動分光分野においては波長のかわりに波数が一般的に用いられる。ラマン散乱光においてその波数シフト量は分子構造に固有で、測定されたラマン散乱光の波数シフト(ラマンシフト)を分析することにより、生体に含まれる分子の同定が可能である。励起光との波数差をx軸に、強度をy軸に描画したものをラマンスペクトルと呼び、x軸からは分子振動の情報、y軸からは分子の濃度情報が得られる<sup>3-10)</sup>。

ラマン分光法は、励起光として可視～近赤外光を使用可能で、水分子の影響が少ない。そのため、乾燥した組織切片の測定のみならず、生理的な環境下にある湿潤な細胞・組織のイメージングも可能である。従って、ラマン分光法は生体分子情報を非標識・非破壊的に計測しうる方法である。本稿では、ラマン顕微鏡の原理と医学・病理学への応用について自験例を中心に解説したい。

### ラマン顕微鏡の原理

ラマン顕微鏡は通常、点照明およびステージスキャンのシステムを装備する。対物レンズにより集束された励起光スポットは、試料平面上の点毎に走査され、画像取得時間は、1点当たりの露光時間、走査速度、取得スペクトル数に依存する。

ラマン顕微鏡では、ラマンスペクトルの空間分布情報を取得するが、ラマンイメージデータは、試料各点のスペクトルを有するハイパースペクトルイメージデータであり、観察試料の(x, y)座標、波数、スペクトル強度の4次元情報を有する(図2)。従って、観察したい目的の波数を決め、その波数におけるラマン散乱光の

強度マッピングを行うことでラマンイメージを構築できる。また、xy平面上の任意の点を選択するとその点でのラマンスペクトルを知ることができる。

ラマン顕微鏡は、光源、発生した散乱光を分光するための分光器、分光した散乱光を検出する検出器から構成される。光源は通常固体レーザーが用いられるが、励起光の波長を基準としてラマンスペクトルを決めるため、励起光は安定な単波長であることや、ラマン散乱光を十分発生させるために高強度光源であることが求められる。波数分解能を高くするために光源のスペクトル幅が狭いことも必要である。分光器の回折格子には多数の溝があり、溝の本数が多いほどスペクトル分解能が高くなる。微弱なラマン散乱光を捉えるには、感度の高い検出器が必要で、検出器の量子効率も波長により変化するため、光源の波長、測定する波数領域に合わせた選択が必要である。可視光光源を用いる場合、冷却CCD検出器が使用されることが多い。また、顕微鏡は正立型でも倒立型でもよいが、高い空間分解能、十分なラマンシグナルを得るために大きな開口数を有する対物レンズを選んで測定することが多い。

ラマン散乱光の強度はレイリー散乱光の強度と比べて $10^{-6}$ 程度と非常に弱いため、従来ラマン顕微鏡の撮像速度は非常に遅く、一枚の画像を取得するのに数時間かかることも珍しくなかった。近年、光学部品/フィルタの改良等により、ラマン画像の取得時間が改善されつつあるが、より撮像速度を速めるために、スリット走査共焦点ラマン顕微鏡が開発された<sup>11-13)</sup>。この顕微鏡は、ライン状照明とスリット走査のシステムにより高速なラマンイメージングを実現している。ライン照明によって試料上の線状の領域から発生したラマン散乱光は、ライン状空間情報を有する複数点(数百点)からの個々のラマンスペクトルとして同時に検出される。スリットは、焦点外の平面からのラマン散乱を除去し、3次元空間分解能と画像コントラストを改善する。すなわち、ライン状のレーザービームをビームと平行に走査して、試料中のラマン

スペクトルの2D分布マップを取得する。スリット走査共焦点ラマン顕微鏡の画像取得時間は、従来のラマン顕微鏡の画像取得時間より100倍程度短くなっている。

### 医学・病理学への応用

ラマン顕微鏡計測は、原理的には1細胞、1小器官レベルでの分析が可能で、病態解析、診断、再生医療、薬剤活性の評価等への応用が期待されてきた。しかし、従来の point illumination and point detection 方式のラマン顕微鏡は撮像スピードが非常に遅く、生体組織分析にはほとんど使われていなかった。

我々は約10年前よりスリット走査共焦点ラマン顕微鏡を用いて虚血性心疾患の研究を行い、1細胞レベルの正常・梗塞心筋を非標識でイメージングできることを初めて報告した<sup>14)15)</sup>。我々は、微弱であるというラマン散乱光の弱点を克服するため、532 nmの励起光を選択することで非共鳴に比べ $10^3$ 倍程度強い共鳴ラマン散乱効果を利用した。ラット冠動脈左前下行枝結紮モデル心(2日後, 5日後, 21日後)および正常ラット心の非染色薄切切片をラマン顕微鏡で観察したところ、健全心筋細胞、凝固壊死心筋、肉芽組織、瘢痕組織のラマンスペクトルは大きく異なっていた(図3a)<sup>16)17)</sup>。すなわち、正常心筋は、 $750\text{ cm}^{-1}$ 、 $1130\text{ cm}^{-1}$ を中心に多数のラマンピークがみられ、これらは還元型シクロムの共鳴ラマンピークと一致していた。凝固壊死心筋のスペクトルは、健全心筋で見られた還元型シクロムのラマンピーク( $750\text{ cm}^{-1}$ )が減弱していた。これは壊死心筋におけるシクロムの減少を反映するものと考えられた。肉芽組織のラマンスペクトルを測定すると、 $1306\text{ cm}^{-1}$ のラマンピークが目立ち、ヘモグロビンのラマンピークと考えられた。これは肉芽組織において *de novo* でヘモグロビン分子が生成されるという報告に合致していた。梗塞瘢痕のラマンスペクトルは、I型コラーゲン分子のラマンスペクトルと一致していた。また、取得したラマンスペクトルを部分最小二乗法判別分析で解析することで、健全心筋と凝固壊死心筋、肉芽組織

を高い感度・特異度(95.3%~99.3%, 96.5%~99.5%)で非標識識別可能であり、ラマン画像を取得できた(図3b)。

ラマン顕微鏡により心筋梗塞巣の組織学的変化を非標識で分析できる可能性が示唆されたが、凝固壊死に陥る前の超急性期の虚血心筋を検出可能かについては充分知られていないため実験を行った。虚血誘導前後のLangendorff灌流ラット心の心膜下心筋のラマンスペクトル(532 nm励起)を測定したところ、還元型シクロムを反映するラマンピーク( $750\text{ cm}^{-1}$ 、 $1127\text{ cm}^{-1}$ )は虚血誘導後すぐに増強した(図4a, b)<sup>18)</sup>。このスペクトル変化は、ミトコンドリアのシクロムcの酸化還元状態を主に反映すると考えられ、テトラメチルローダミンエチルエステル、トリフェニルテトラゾリウムクロリドにより測定されたミトコンドリア膜電位変化や代謝活性変化に比し早期に検出できた。ラマン顕微鏡は、通常の組織学的検索では捉えるのが困難な超急性期虚血心筋もミトコンドリア機能に基づいて非標識的に分析可能であり、更なる研究を続けている。

前立腺、直腸の術後合併症には、温存すべき末梢神経が切断されることによる生じる排尿障害などがある。細い末梢神経は肉眼では見分けにくく、術者が末梢神経の走行を詳細に確認しながら手術することは困難である。我々は、前処置不要な末梢神経術中検出法の創出を目指して、ラマン顕微鏡を用いて原理検証実験を行った<sup>19)20)</sup>。末梢神経(有髄・無髄神経)およびその周囲組織(線維性結合組織、脂肪)をヒト前立腺周囲組織から採取し、凍結薄切標本作成後にラマン顕微鏡計測を行った(図5)。各組織のラマンスペクトルは、高波数領域( $2850\text{ cm}^{-1}$ 、 $2891\text{ cm}^{-1}$ 、 $2932\text{ cm}^{-1}$ )で顕著な違いが見られた(図5b)。有髄神経は脂質豊富な髄鞘を持つが、 $\text{CH}_2$ 伸縮振動のラマンピーク( $2850\text{ cm}^{-1}$ 、 $2891\text{ cm}^{-1}$ )が強く、髄鞘を持たず脂質が少ない無髄神経は $\text{CH}_3$ 伸縮振動のラマンピーク( $2932\text{ cm}^{-1}$ )が強調されていた。最小二乗法により推定した各比例定数を用いて作成したラマンイメージは組織像とよく相関しており(図5a, c)、ラマン顕

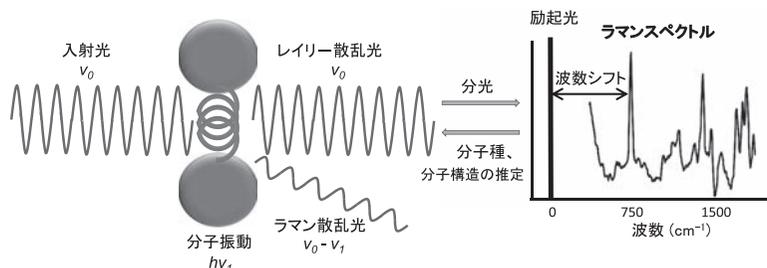


図1 ラマン散乱分光. ラマン散乱光は、光を分子に入射したときに入射光とは異なる振動数で観察される散乱光で、分子固有の分子振動に依存して波数がシフトする. ラマン散乱光を分光し、分析することで、分子の同定が可能となる.

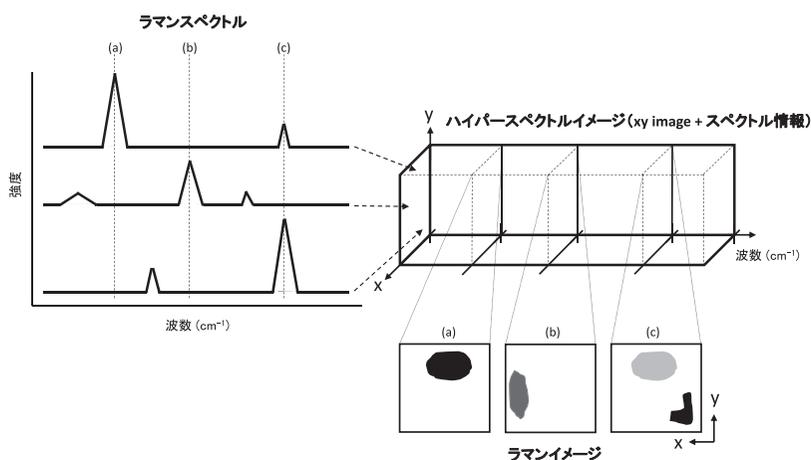


図2 ラマンイメージ. ラマン顕微鏡では、観察対象物の  $x, y$  平面上のピクセル毎にラマンスペクトルを測定する. 取得したデータは、位置情報 ( $xy$  情報) とスペクトル情報を有したいわゆるハイパースペクトルイメージデータとなる. 例えば、観察したい波数 (a), (b), (c) において、その波数におけるラマン散乱光の強度マッピングを行い、ラマンイメージを作成することができる.

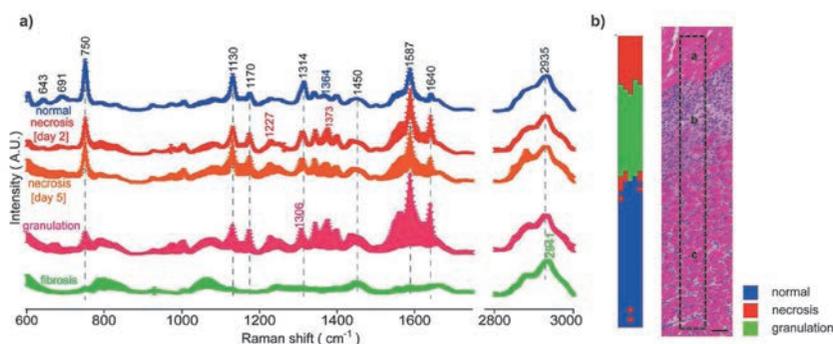


図3 ラマン顕微鏡による心筋梗塞イメージング

(a) 正常心筋 (normal), 凝固壊死心筋 (necrosis), 肉芽組織 (granulation), 梗塞瘢痕 (fibrosis) のラマンスペクトル. ラット心を用いて検討. (b) 梗塞境界部のラマンイメージング. ラマンスペクトルを取得し、部分最小二乗法判別分析で解析し画像化した (左). HE 染色 (右). タイロッド液で血液を wash out 後にラット心筋梗塞巣を観察. Scale bar=50  $\mu\text{m}$ . 532 nm 励起. (文献 16 より転載)

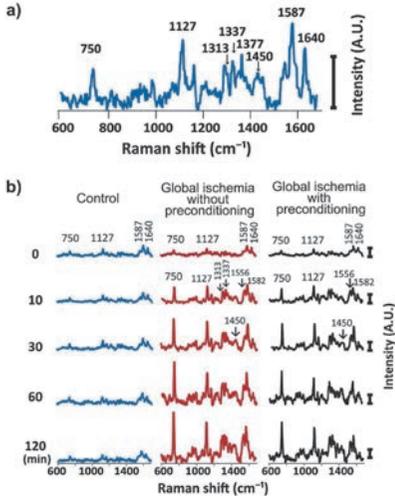


図4 虚血誘導前後のLangendorff灌流ラット心のラマンスペクトル。

(a) 虚血誘導していないLangendorff灌流ラット心の心膜下心筋のラマンスペクトル。750, 1127, 1587, 1640  $\text{cm}^{-1}$ を中心に多数のラマンピークがみられる。

(b) 虚血誘導前後のLangendorff灌流ラット心の心膜下心筋のラマンスペクトルの経時変化。コントロール群(虚血誘導なし), 虚血プレコンディショニングせずに虚血誘導した群, 虚血プレコンディショニング後に虚血誘導した群を示す。750, 1127  $\text{cm}^{-1}$ のラマンピーク(還元型シトクロムを反映)は虚血誘導後すぐに増強した。532 nm 励起。(文献18より転載)

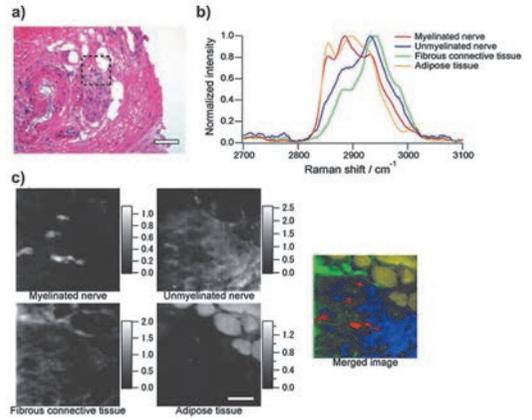


図5 ヒト前立腺周囲組織のラマンイメージング。(a) 前立腺周囲組織のHE染色像。(b) 末梢神経(有髄神経 myelinated nerve, 無髄神経 unmyelinated nerve) およびその周囲組織(線維性結合組織 fibrous connective tissue, 脂肪組織 adipose tissue)のラマンスペクトル。(c) ラマンイメージ。(a)のボックス内のラマンスペクトルを測定し画像化した。Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (a), 30  $\mu\text{m}$  (c)。(文献19より転載)

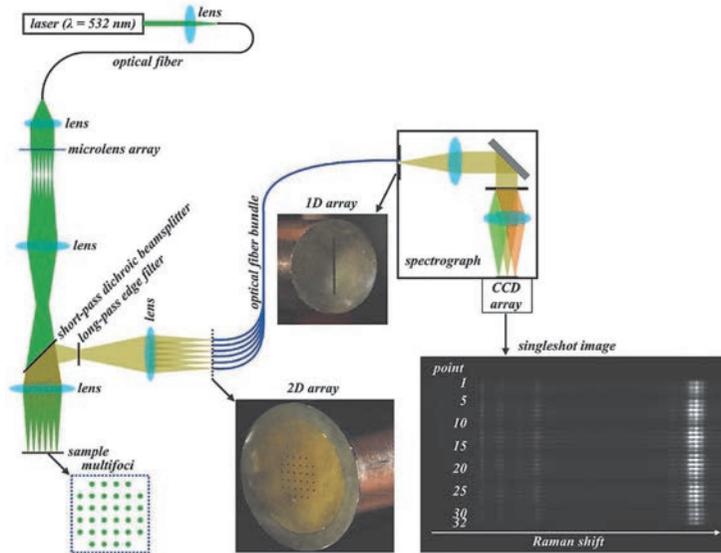


図6 ファイバーバンドルとマイクロレンズアレイを有するラマン分光計測機器。標本上の32点のラマンスペクトルを同時に取得可能である。(文献21より転載)

微鏡を用いて末梢神経を無染色で鑑別することが可能であった。

この結果に基づき、我々は多点ラマン散乱計測技術を利用した末梢神経検知法を開発した。ラマン散乱光による末梢神経検知を手術応用しようすると、一定の広さの術野に分布する末梢神経の走行をごく短時間で可視化する必要があるため、ファイバーバンドルとマイクロレンズアレイを有するラマン分光計測機器を作製した(図6)<sup>21)</sup>。これにより、ラット摘出末梢神経、骨格筋組織、結合組織からなる標本上の32点のラマンスペクトルを5秒で取得できた。取得したスペクトルを主成分回帰、判別分析したところ、末梢神経を感度85.8%、特異度96.0%で同定できた。また、明視野画像とラマンスペクトル情報を組み合わせるアルゴリズムを構築し検討すると、感度96.2%、特異度99.2%で末梢神経を検知できた。今後、より広い視野を観察可能な、ユーザーフレンドリーなラマン分光計測機器を構築し、非標識・非破壊的な末梢神経術中検知法を創出していきたいと考えている。

ラマン顕微鏡を生体分析に応用する際の今後の課題として以下のような点が考えられる。ラマン分光法は取得できる情報が複雑かつ多面的なため、細胞や組織の状態を評価するのがしばしば困難である。そのため、ラマンスペクトルから重要な特徴量を効率良く拾い上げ、同定可能な手法を開発する必要がある。細胞状態の情報は高次元スペクトル空間では非線形に存在するため、従来使用されている線形主成分分析による次元削減では、貴重な情報を損なう可能性がある。また、ラマンイメージはシグナル/ノイズ比(S/N)が低いため、長時間露光によりS/Nを高めているが、露光時間が長くなると細胞が光酸化を起こしダメージを受ける。そのため、S/Nが低い条件下でも目的に応じた精度で

特徴量を抽出でき、得られた情報を実時間でラマンイメージングに活かせるような高速イメージング手法の構築が必要である。

## ま と め

ラマン散乱光は信号強度が非常に弱く測定は難しいが、得られる情報量は比較的多く、生体組織を非破壊的に測定可能である。ラマン顕微鏡は、生きている試料を遺伝子導入等の前処理を行わずにイメージングし、創薬や再生医療への再利用を可能とする、ほぼ唯一の分子計測法であろう。S/Nの低いラマンイメージから有用な情報を効率よく抽出するためには、従来の主成分分析などの解析技術だけでなく、情報科学・統計数理手法を応用した新たな特徴量抽出技術の開発が必要である。近年、ラマン散乱光を高速に取得可能な非線形光学顕微鏡(誘導ラマン散乱顕微鏡<sup>22)</sup>(stimulated Raman scattering microscopy: SRS microscopy)やコヒーレント反ストークスラマン散乱顕微鏡<sup>23)</sup>(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering microscopy: CARS microscopy))やラマンイメージングに有用なプローブ<sup>24)</sup>の開発も進んでいる。更なる技術開発によって、ラマン顕微鏡が医学・生物学者に将来身近な存在になることを期待している。

## 謝 辞

紹介した研究は、京都府立医科大学大学院医学研究科高松哲郎教授、田中秀央教授、夜久均教授、小川貢氏、村西菜苗氏、大平卓氏、南川丈夫元助教、熊本康昭助教らとともに行いました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。本稿は参考文献3)~9)を加筆、修正し作成した。

著者は、東レエンジニアリング株式会社から研究費を受領している。

## 文 献

- 1) Raman CV, Krishnan KS: A new type of secondary radiation. *Nature* 1928; 121: 501-502.
- 2) Harada Y, Takamatsu T: Raman molecular imaging of

cells and tissues: towards functional diagnostic imaging without labeling. *Curr Pharm Biotechnol* 2013; 14: 133-140.

- 3) 原田義規, 高松哲郎: 医療応用をめざした光による in vivo 分子イメージング. 実験医学増刊 2012; 30: 191-196.
- 4) 原田義規, 高松哲郎: 光イメージングで病気をみる. 臨病理 2012; 60: 119-124.
- 5) 南川丈夫, 原田義規, 高松哲郎: 無染色組織イメージング～ラマン散乱分光法を用いて～. 京府医大誌 2013; 122: 209-217.
- 6) 原田義規, 南川丈夫, 高松哲郎: 光を利用した非標識生体分子イメージング. G. I. Research 2014; 22: 44-49.
- 7) 南川丈夫, 原田義規, 高松哲郎: ラマン散乱顕微鏡による分子イメージング. 光アライアンス 2014; 25: 21-25.
- 8) 原田義規, 南川丈夫, 高松哲郎: ラマン分光法による生体情報の可視化. OPTRONICS 2014; 5: 70-73.
- 9) 原田義規, 田中秀央, 高松哲郎. ラマン分光顕微鏡とその医学・病理学への応用. 病理と臨 2015; 33: 1009-1016.
- 10) 藤田克昌: ラマン散乱光を用いた生体分子の顕微観察. 組織細胞化学 2010; 2010: 101-109.
- 11) Hamada K, Fujita K, Smith NI, Kobayashi M, Inouye Y, Kawata S. Raman microscopy for dynamic molecular imaging of living cells. J Biomed Opt 2008; 13: 044027.
- 12) Okada M, Smith NI, Palonpon AF, Endo H, Kawata S, Sodeoka M, Fujita K. Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: 28-32.
- 13) Harada Y, Ota T, Ping D, Yamaoka Y, Hamada K, Fujita K, Takamatsu T. Imaging of anticancer agent distribution by a slit-scanning Raman microscope. Proceedings of SPIE 2008; 6853: 685308.
- 14) Ogawa M, Harada Y, Yamaoka Y, Fujita K, Yaku H, Takamatsu T. Label-free biochemical imaging of heart tissue with high-speed spontaneous Raman microscopy. Biochem Biophys Res Commun 2009; 382: 370-374.
- 15) 高松哲郎, 小川 貢, 原田義規 ラマン散乱を用いた生体組織イメージング 特許第 5372137 号
- 16) Nishiki-Muranishi N, Harada Y, Minamikawa T, Yamaoka Y, Dai P, Yaku H, Takamatsu T. Label-free evaluation of myocardial infarction and its repair by spontaneous Raman spectroscopy. Anal Chem 2014; 22: 17063-17072.
- 17) 高松哲郎, 原田義規, 南川丈夫, 村西菜苗, 石井勝弘, 右近寿一郎, 青山淳一 ラマン散乱を用いた心臓組織の識別方法及び装置 特許第 6103700 号
- 18) Ohira S, Tanaka H, Harada Y, Minamikawa T, Kumamoto Y, Matoba S, Yaku H, Takamatsu T. Label-free detection of myocardial ischaemia in the perfused rat heart by spontaneous Raman spectroscopy. Sci Rep 2017; 7: 42401.
- 19) Minamikawa T, Harada Y, Koizumi N, Okihara K, Kamoi K, Yanagisawa A, Takamatsu T. Label-free detection of peripheral nerve tissues against adjacent tissues by spontaneous Raman microspectroscopy. Histochem Cell Biol 2013; 139: 181-193.
- 20) 高松哲郎, 南川丈夫, 原田義規 ラマン散乱分光法による神経検出方法及び装置 特許第 6180404 号
- 21) Kumamoto Y, Harada Y, Tanaka H, Takamatsu T. Rapid and accurate peripheral nerve imaging by multipoint Raman spectroscopy. Sci Rep 2017; 7: 845.
- 22) Freudiger CW, Min W, Saar BG, Lu S, Holtom GR, He C, Tsai JC, Kang JX, Xie XS. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. Science 2008; 322 (5909): 1857-1861.
- 23) Hashimoto M, Araki T. Three-dimensional transfer functions of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis 2001; 18: 771-776.
- 24) Yamakoshi H, Dodo K, Okada M, Ando J, Palonpon A, Fujita K, Kawata S, Sodeoka M. Imaging of EdU, an alkyne-tagged cell proliferation probe, by Raman microscopy. J Am Chem Soc 2011; 133: 6102-6105.

## 著者プロフィール



原田 義規 Yoshinori Harada

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科細胞分子機能病理学・准教授

略 歴：1992年3月 京都府立医科大学医学部 卒業

1992年5月 京都府立医科大学第三内科

1996年6月 カナダ Calgary 大学医学部生化学教室留学

1999年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科卒業, 博士(医学)号取得

2004年4月 京都府立医科大学細胞分子機能病理学助手

2012年10月 京都府立医科大学細胞分子機能病理学講師

2015年7月～現職

専門分野：病理学, 消化器病学

最近興味のあること：2016年より JST CREST の支援を受けて「一細胞ラマン計測と情報科学の融合による細胞診断の迅速解析技術の開発」のテーマに従事しています。先端光技術による生体イメージング法の開発とその病態解析への応用を目指した研究を今後も展開させたい。

主な業績：

- 原著：1. Koizumi N\*, Harada Y\*, Beika M, Minamikawa T, Yamaoka Y, Dai P, Murayama Y, Yanagisawa A, Otsuji E, Tanaka H, Takamatsu T. Highly sensitive fluorescence detection of metastatic lymph nodes of gastric cancer with photo-oxidation of protoporphyrin IX. *Eur J Surg Oncol* 2016; 42: 1236-1246.
2. Minamikawa T, Harada Y, Takamatsu T. Ex vivo peripheral nerve detection of rats by spontaneous Raman spectroscopy. *Sci Rep* 2015; 5: 17165.
3. Nishiki-Muranishi N\*, Harada Y\*, Minamikawa T\*, Yamaoka Y, Dai P, Yaku H, Takamatsu T. Label-free evaluation of myocardial infarction and its repair by spontaneous Raman spectroscopy. *Anal Chem* 2014; 22: 17063-17072.
4. Imaizumi K\*, Harada Y\*, Wakabayashi N, Yamaoka Y, Konishi H, Dai P, Tanaka H, Takamatsu T. Dual-wavelength excitation of mucosal autofluorescence for precise detection of diminutive colonic adenomas. *Gastrointest Endosc* 2012; 75: 110-117.
5. Murayama Y\*, Harada Y\*, Imaizumi K, Dai P, Nakano K, Okamoto K, Otsuji E, Takamatsu T. Precise detection of lymph node metastases in mouse rectal cancer by using 5-aminolevulinic acid. *Int J Cancer* 2009; 125: 2256-2263.

\*These authors contributed equally to this work.

知的財産権：

・特許第 5070549 号, 特許第 5372137 号, 特許第 6103700 号, 特許第 6180404 号他