

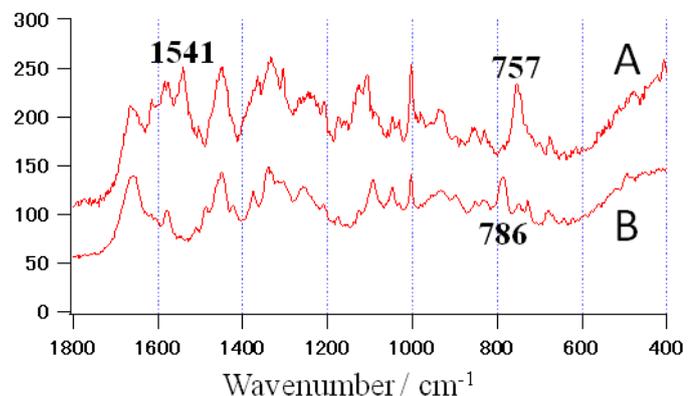
## 4P087

### 多変量スペクトル分解による単一生細胞ラマンイメージの分子科学的解釈

(東大院理\*、NCTU\*\*) ○小野木智加朗\*、安藤正浩\*、濱口宏夫\*\*

【序】生命科学の発展においては、生体内分子の時空間局在や機能、反応機構を明らかにすることが極めて重要である。蛍光分光による所謂バイオイメージング手法が大きな成果を収めているが、特定のプローブ分子に依存した情報に偏っている面もあり、より多様な分子種の情報を前処理なく取得できる実験、解析手法が求められている。振動分光、とくにラマン分光は、豊富な分子情報を時空特異的に取得することが可能であり、その生細胞への応用は近年目覚ましい発展を見せている。しかしながら、分子振動スペクトルはそれが持つ情報の多さゆえに極めて複雑であり、解釈が困難であるという難点がある。本研究では生細胞中の多点（400点）のラマンスペクトルを顕微ラマン分光により測定し、得られた多量のスペクトルに対し、多変量解析による主要スペクトル成分の抽出を試みた。顕微ラマン分光装置の発展により、ラマンスペクトルの取得時間が短縮され、得られるスペクトルの数が飛躍的に多くなっている。多変量解析を用いることで、その多くのスペクトルの集合の中から、異なる空間局在を示す主要なスペクトルを非経験的に取り出すことができる。この手法を用いることで、多量のラマンスペクトルの短時間での解析が可能となり、ラマン分光のさまざまな応用において、恣意性のない定量的解析法が確立されるものと期待される。

【実験と解析】試料はヒト末梢血液中の白血球を使用した。白血球には好中球、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球の異なる5種の細胞が含まれる。これらの白血球細胞40個（種別不明）のラマンイメージを測定した。測定には自作した顕微ラマン分光装置を使用した。励起波長は632.8 nm、レーザーパワーは18 mW、細胞一体あたり約500 nm 間隔で400点測定した。各点の測定時間は0.5ないし1秒である。各測定点から得られたラマンスペクトルに特異値分解解析によるノイズ除去を行った後、多変量解析を行った。採用するスペクトルコンポーネントの数は特異値分解解析の結果より決定した。スペクトルコンポーネントの初期値は、特異値解析の結果の基底及び、乱数で生成した基底の2種類を用いた。多変量解析のアルゴリズムは、lasso回帰<sup>1)</sup>による正則化非負最小二乗法による多変量スペクトル解析を用いて行った。



【結果と考察】図1に好中球のラマンスペクトルを示す。図中のスペ

図1：好中球中のラマンスペクトル

クトルは細胞中の異なる 2 点のスペクトルであり、それぞれ細胞中の物質の分布を反映して異なる振動スペクトルを示している。両者のスペクトルには共通して、 $1003\text{ cm}^{-1}$  のタンパク質に帰属されるバンドが見られるが、A においては、 $757$ 、 $1541\text{ cm}^{-1}$  のバンドが特徴的に表れる一方、B においては  $786\text{ cm}^{-1}$  の核酸に帰属されるバンドが明瞭に観測されている。このように、両者が複数の分子種を異なる比率で含むことが、解析を困難にしている要因である。多変量スペクトル解析を適用した結果を図 2 に示す。それぞれのスペクトルは、a: 水を含むバックグラウンド、b: タンパク質、c: ポルフィリン様分子種、d: 核酸に近いスペクトルを示しており、細胞内の分子種の分布が、大略これら 4 つのスペクトルの足し合わせで表されることを示唆している。また、e、f、g、h はそれぞれ、a、b、c、d の空間分布を示しており、細胞内の分子種の分布を明瞭な形で得ることができた。多変量スペクトル分解を適用することにより、スペクトル中の単一の振動バンドのみに依存することなく、スペクトル全体の情報を同時に利用して、各分子種の情報を半自動的に得ることができることがわかった。また、図として示してはいないが、好中球の他に好酸球やリンパ球についても同様の解析を行っており、好酸球中においては好中球とは明らかに異なるスペクトルを得た。多変量スペクトル分解を用いることにより、白血球の種類を無染色かつ迅速に識別することも可能であると考えられる。

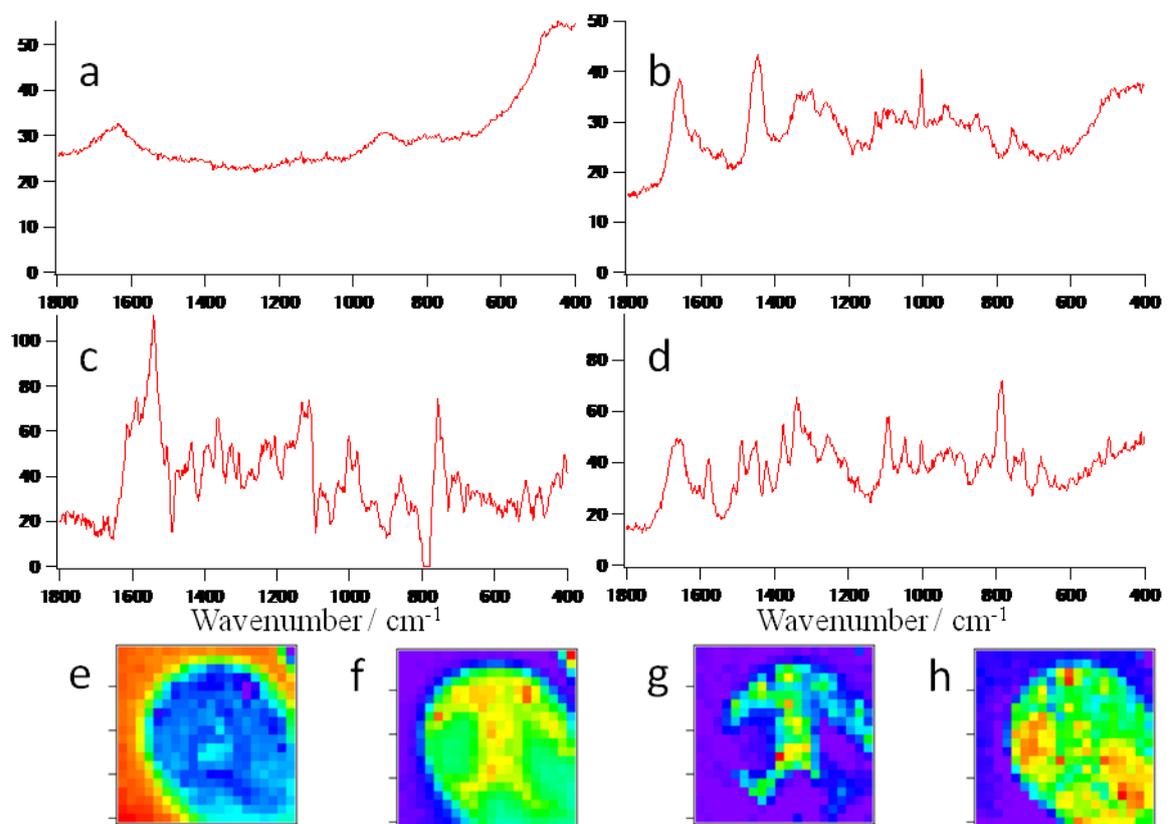


図 2 : 好中球中のラマンイメージに対する多変量スペクトル分解の結果

【参考文献】

- [1] R. Tibshirani, et al. *J. Royal. Statist. Soc.* **58**, No.1, 267-288 (1996)