

関西学院大学 研究成果報告

2022年 3月 16日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：岩崎 啓太

以下のとおり、報告いたします。

| | |
|--------|---|
| 研究制度 | <input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。 |
| 研究課題 | ラマン分光分析によるヒト感染性ウイルスのリアルタイム検出技術の実用化研究 |
| 研究実施場所 | 理工学研究科 佐藤研究室 |
| 研究期間 | 2021年 10月 1日 ～ 2022年 3月 31日 (6ヶ月) |

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

本研究課題では、環境中に存在するヒト感染性ウイルスを検出する技術の実用化を目指している。先行研究では、顕微ラマン分光法で取得したラマンスペクトルデータを多変量解析することによって、アデノウイルスを感染処理したヒト由来培養細胞(HEK293)と、感染処理をしていない細胞との判別が、感染処理後3時間で可能であることが示された(Moor et al., 2018)。この方法は、ヒトが病原性ウイルスに感染し、症状を示したのちに抗原・抗体検査を受けたり、PCR検査を受けたりするより早く病原性ウイルスを検出できる可能性があり、病原性ウイルスの拡散防止に役立つことが期待される。この技術を実用化するためには、感染機構の異なる種々のウイルスを培養細胞に感染させ、その応答を調べる必要がある。ラマン分光法は、微弱な光の散乱を検出する方法であり、データの取得や処理において担当する個人の技術が結果に与える影響が大きい。また、細胞の応答をリアルタイムで検出するためには、実験室の条件で取得したデータとそのデータを基にした判別モデルが、環境中から収集したウイルスを培養細胞に感染させて測定するデータに対しても有効であるように、試料調製から測定方法、解析アルゴリズム等を設計し、測定から解析までが自動で行われる必要がある。

当該期間は、人的介入を極力減らしたデータ前処理による判別モデル作成を行うために、測定方法や解析方法を検討した。行った実験は先行研究を模した、HEK293培養細胞

に対する、GFP expression Adenovirus (GenTarget Inc) の感染処理と、顕微ラマン分光法 (785 nm 励起) によるラマンスペクトル測定、多変量解析である。

まず、ウイルスストックを培養細胞に感染処理する際の条件である感染多重度を一定にするために行う細胞計数を画像処理で行えるよう検討した。解析ソフト Image J を用いて顕微鏡下における細胞密度を求めることで、感染処理する培養ディッシュに存在する総細胞数を求めた。Image J を用いた細胞カウントと、目視による細胞カウントはおおむね良い一致を示し、妥当な細胞増殖曲線を得た。継代操作時に行うセルカウンタープレートによる計測 (改良ノイバウエルタイプ) ともよい一致を示した。

次に、ラマンスペクトルの前処理方法の検討を行った。測定データに含まれる培養ディッシュの石英窓の寄与を差分して除くための処理、蛍光の寄与を除くためのベースライン除去について行った。石英窓の寄与は、培養培地や細胞のない状態で測定したラマンスペクトルの 490 cm^{-1} 付近のピーク強度で規格化することで、おおむね良く除去することができた。蛍光ベースライン除去に関しては、多項式フィッティングを繰り返す方法 (LIEBER et al., 2003) が自動化として有用であるが、ラマンスペクトルの低波数側と高波数側の両末端の推定が大きく外れる場合があり、問題であった。最適な多項式の次数を選択する方法や、フィッティングの際の重み付けを利用したアルゴリズムを考案し試したが、問題解決に至らなかった。妥協策として、等間隔処理に用いるラマンシフトの内挿範囲を多項式フィッティングによる推定が問題ない範囲に限定することを考えた。等間隔処理は独立複数回の実験データを解析する際に便利な処理で、蛍光ベースライン推定の問題に伴うアーティファクトを除くために使用することも合理的であると考えた。しかし、内挿範囲を限定することはデータ量を減らすというデメリットにつながるため、蛍光ベースライン除去の自動化は引き続き検討する必要がある。蛍光ベースラインを多項式フィッティングで推定し除く場合、ラマンバンドのある位置を無視してフィッティングする方法があり、ピーク検出法と組み合わせることで人的介入要素を除いたアルゴリズム構築を目指す。

実際に感染処理を行い、感染処理 4 時間後までのデータを取得し、上述のような前処理を行った後、主成分解析を行った結果を図 1 に示す。感染 3 時間後から主成分 9 のスコアが感染処理前やアデノウイルスを用いず操作だけをしたコントロール

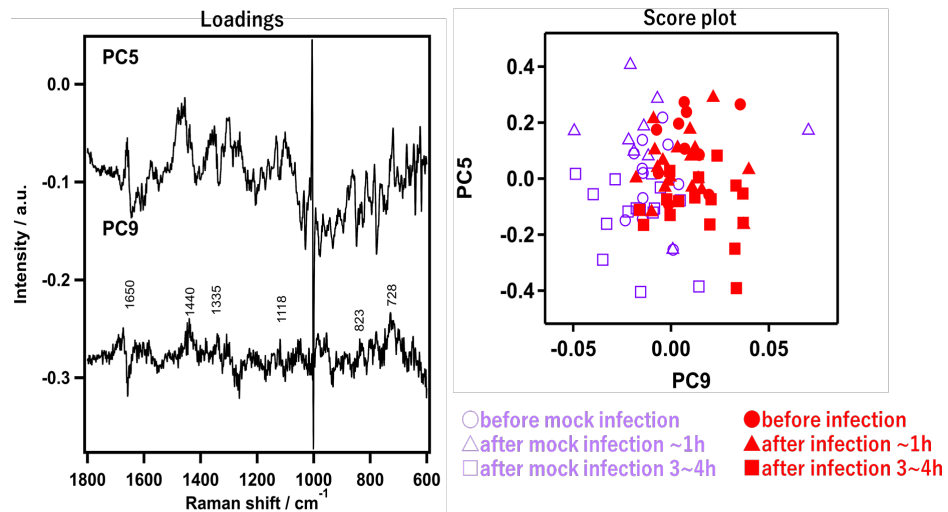


図 1: 主成分解析による Loadings (左) と Score プロット (右)。

(mock) との違いを示した。引き続き同様の実験を繰り返し、再現性を確認するとともに、他のウイルスや宿主での判別を可能とするモデル作成にも適用していく予定である。

これらの解析は Igor Pro (WaveMetrics) を用いて行った。一方で Jupyter Lab もしくは Colaboratory (Google) を用いた解析環境へ移行するため、公開されているパッケージの利用や、自作のモジュールを実装するなどの作業を行った。これらの環境の利点は、プログラミング言語 python の処理の履歴がノートブック上に記録されることで、処理の結果を逐次的かつグラフィカルに確認しながら解析するために役立つ。同じ処理を違うデータセットに対して行うことも容易なため、リアルタイム検出の実用化のため活用する予定である。

以上

提出期限: 研究期間終了後 2ヶ月以内

※個人特別研究費: 研究費支給年度終了後 2ヶ月以内 博士研究員: 期間終了まで

提出先: 研究推進社会連携機構 (NUC)

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。