



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Study on Single Cell Raman Analysis to Enhance Differentiability of Cell Types in Non-homogeneous Environments [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s)           | Abdul, Halim Bhuiyan                                                                                                                                                              |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                                                                             |
| Degree Name         | 博士(総合化学)                                                                                                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第15633号                                                                                                                                                                          |
| Issue Date          | 2023-09-25                                                                                                                                                                        |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/90791">https://hdl.handle.net/2115/90791</a>                                                                                                 |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>                                                                           |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                                                                                   |
| File Information    | Abdul_Halim_Bhuiyan_review.pdf, 審査の要旨                                                                                                                                             |



# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（総合化学） 氏名 アブドル ハリム ブーヤン

|       |    |    |        |
|-------|----|----|--------|
| 審査担当者 | 主査 | 教授 | 武次 徹也  |
|       | 副査 | 教授 | 小松崎 民樹 |
|       | 副査 | 教授 | 伊藤 肇   |
|       | 副査 | 教授 | 高橋 啓介  |

## 学 位 論 文 題 名

Study on Single Cell Raman Analysis to Enhance Differentiability of Cell Types in  
Non-homogeneous Environments  
(不均一環境下における細胞識別性向上に関する 1 細胞ラマン解析研究)

ライン照明型自発ラマン顕微鏡は、従来の点照明型に比して、約 400 倍の迅速化を実現し、生体試料の形態情報と背後の分光情報を同時に獲得することが可能な分光計測技術である。特に、指紋領域と呼ばれる広範囲なラマンシフトが重要となる細胞や組織などの生物試料を含む幅広い応用が期待されている。ラマン分光画像解析において、宇宙線除去、光子の数揺らぎに基づくノイズ除去、ベースライン除去と呼ばれる自発蛍光に由来する寄与を近似的に取り除く前処理手法が標準的に用いられている。ライン照明型自発ラマン顕微鏡ではライン状の照射光の不均一な強度分布が存在する。通常の試料であれば問題視されることはないが、例えば、ラマン分光情報の差が大きい「甲状腺濾胞がん細胞株」、「甲状腺上皮細胞株」の識別ではこれらの不均一な強度分布の存在が解析結果に大きく影響する。本論文は、このような現況において、甲状腺濾胞がん細胞株 FTC-133 と正常な甲状腺上皮細胞株 Nthy-ori 3-1 に対し、第一に、空間位置に依存しないで設定する従来の波数校正に対しライン上の位置依存的に波数校正を行う手法を開発した。第二に、開発した位置依存的波数校正手法とともに不均一な強度分布の寄与をノンパラメトリックなアンサンブル学習であるランダムフォレスト回帰と主成分解析を融合したトレンド除去手法を新規に開発し、不均一なレーザー強度ムラから生じる人工的なバイアスを最小限に抑え、がんか否かの識別精度を、従来法に比して、著しく向上させることに成功した。本来、細胞は同じ遺伝型であっても遺伝子発現などの違いにより、完全に同一な細胞は存在しない。そのため、細胞間のラマン分光画像データに差が顕著な存在していても完全に否定できるものではなく、計測ないし解析上のアーティファクトであり得ても見落とされてきた。本論文はそれらのアーティファクトを数理的に可能な限り抑え、背後に存在する“表現型由来の正しい差違”を抽出することを可能とするものである。

本論文は 5 章構成になっている。

第 1 章では、本論文の目的と研究背景が述べられている。

第 2 章では、主成分解析、特異値分解、ランダムフォレストなどのいくつかの予備的な概念について詳解している。

第 3 章では、ラマン分光解析で最も良く用いられている標準的前処理手法、さらに照射ライン上の位置依存的に波数校正を行う前処理手法、そして、さらにランダムフォレスト回帰と主成分解析を融合し、不均一な強度分布ムラを補正する前処理手法の 3 つについて詳解している。

第 4 章では、甲状腺濾胞がん細胞株 FTC-133 と正常な甲状腺上皮細胞株 Nthy-ori 3-1 に対し、これら 3 つの前処理手法による結果に対し詳細な比較を展開している。第一に、前処理を施された各ラマンシフトの分光画像と照明軸、スキャン軸とのピアソン相関係数を評価し、従来法においては、その相関係数が顕著に大きな数値を有するのに対し、開発手法では除去されていること、第二に、ラマン

画像における二つの細胞株の識別性能を比較分析し、各シングルセルに対して平均化されたラマンスペクトルの多次元尺度構成法による 2 次元空間での可視化、ランダムフォレスト分類器モデルを用いた交差検定を行い、開発した前処理手法では、異なる細胞株をラマン画像により正しく識別できることを実証している。また、k-平均法によりラマンスペクトルが似通っているピクセルをクラスタリングし、化学的性質が類似した部分領域を抽出し、それが細胞のオルガネラに対応すること、従来法では同じ細胞株由来の単一細胞内の部分領域のふるまいに大きなばらつきが存在するのに対し、開発した手法では、そのばらつきが抑制されていること、すなわち、従来の解釈—同じ遺伝型であっても遺伝子発現が異なるため、表現型は変化し得、それがラマン画像に反映する—と短絡的に捉えることが危険であることを示唆するものであり、本手法を用いることで表現型の多様性を正しく評価できることを示している。

第 5 章では、本手法の限界、今後の展望を述べている。

以上が本論文の要旨である。これを要するに、著者は、従来の点型照明に比して 400 倍の迅速化を達成するライン照射型自発ラマン顕微鏡における不可避な強度ムラを、アンサンブル学習のひとつであるランダムフォレスト回帰と主成分解析を融合することで開発したトレンド除去手法により補正し、ラマン分光画像により細胞や組織の表現型由来の差違、多様性を正しく評価するための方向性を具体的に示すことに成功した。従来の細胞病理は免疫染色画像に依拠しており、ラマン分光画像は形態情報と化学情報を併せ持つものであり、細胞の状態を系統的に正しく理解するうえで著者が貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（総合化学）の学位を授与される資格あるものと認める。