

# 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業・報告

## ラマン分光法による診断法の開発

田中 裕之・沼田 靖・小林 厚志 （日大工・生命）

### 【序論】

ラマン分光法は赤外線吸収スペクトル（IR）と同様に、分子の振動準位の情報を得ることができる（Figure 1）。

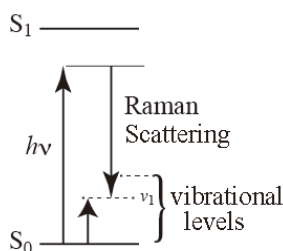


Fig. 1 Energy diagram of Raman scattering.

ラマン分光法の利点として、①分子の散乱現象を利用するため、どんな分子・相にも適応可能である。②水のピークが大きく現れないため、水溶液でも利用可能である。③励起光にレーザーを用いるため、高分解能である。そのため、分子の構造や定性分析によく用いられてきた。しかし、散乱現象を利用するため入射光の強度にラマン強度は依存する。そのため、定量分析にはあまり用いられてこなかった。これまでの研究において、入射光強度や基準試料のラマン強度に対する試料のラマン強度比が濃度に比例することを見だし、種々の系に応用してきた。

本プロジェクトにおいて、我々のグループでは疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行うことを目標とした。この研究で、アミノ酸や脂質、糖のラマンスペクトルから強度比が濃度に比例することを見出した。また、通常細胞とがん細胞のラマンスペクトルを比較し、がん特有のピークを見つけることについても研究を行なった。

### (1) アミノ酸

アミノ酸の定量分析には高速液体クロマトグラフィ（HPLC）が広く用いられている。この方法は非常に高感度で再現性が良いという利点があるが、アミノ酸は発色団をもっていないものが多いので、カラムによる分離の前または後に誘導体化を行い、検出する必要がある。そのため、分離することなしに、アミノ酸混合溶液を同時定量できる方法を開発することが本研究の目的である。本研究ではラマン分光法をアミノ酸水溶液の定量分析に応用することを試みた。この研究におい

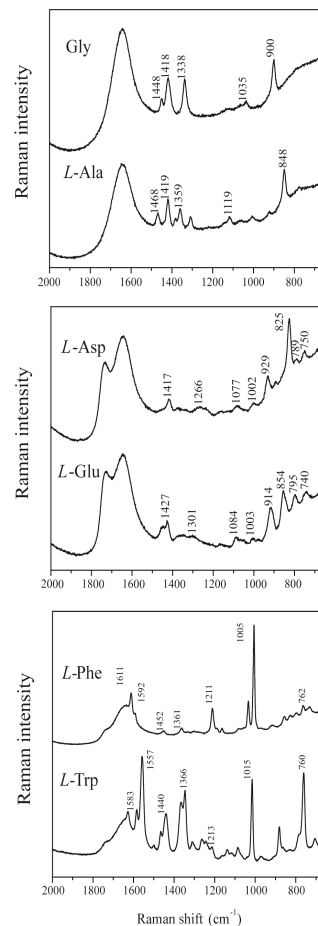


Fig. 2 Raman spectra of amino acids.

て、L-アラニン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-フェニルアラニンおよびL-トリプトファン の 6 種のアミノ酸およびそれらアミノ酸混合溶液における定量分析結果を報告する。

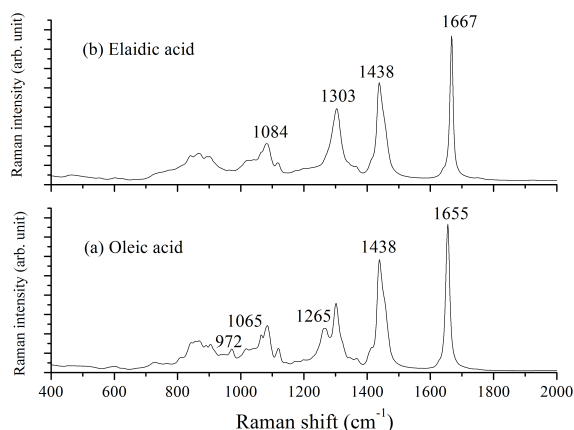
Figure 2 にアミノ酸のラマンスペクトルを示す。同じ振動モードであっても置換基の違いにより、ラマンピークが異なることがわかる。種々の濃度に対して各分子の特有のラマンピーク強度比をプロットすることにより検量線を得た。その検量線は良い直線性を示し、ラマン分光法により、定量分析が可能であることを示した。

### (2) 脂肪酸

脂肪酸はカルボキシ基を持つ鎖状炭化水素である。食品中などに含まれ、細胞膜の生成や活動の際のエネルギー源に使われるなど、人間が生命活動を行う上で重要な成分である。脂肪酸は二重結合を持たない飽和脂肪酸と二重結合を持つ不

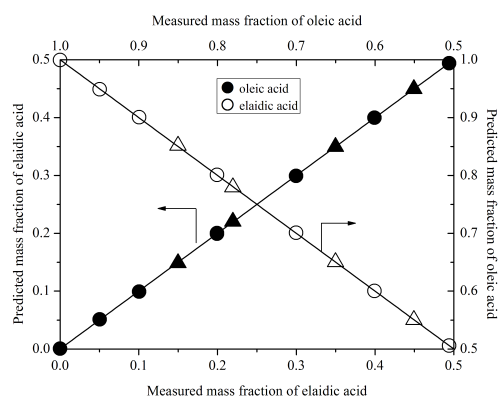
飽和脂肪酸に分類でき、さらに不飽和脂肪酸は二重結合を構成する炭素に結合する水素の向きによってシス脂肪酸とトランス脂肪酸に分類される。天然に存在する不飽和脂肪酸はほとんど *cis* 体であるが、マーガリンやショートニングなどの固形油を製造する際の水素添加過程でシス体からトランス体が生成されることがある。このトランス脂肪酸は血中の悪玉コレステロール増加、善玉コレステロール減少を招き、動脈硬化をはじめとする心筋梗塞や脳梗塞などの様々な疾患を引き起こすといった人体への悪影響がある。このことから食品に含まれるトランス脂肪酸の量の表示が義務付けられたり、トランス脂肪酸が食品中に入らないようにしたりする試みが行われている。そのため、製造現場で使用できる定量分析法が必要となる。そこで、本研究では、*cis* 体のオレイン酸と *trans* 体のエライジン酸のラマン分光法による同時定量を行なった。

Figure 3 に (a)オレイン酸と(b) エライジン酸のラマンスペクトルを示す。エライジン酸の融点は  $45^{\circ}\text{C}$  なので、加熱して溶かしてすぐにスペクトルの測定を行なった。オレイン酸の目立ったピークは  $1655$ ,  $1438$ ,  $1300$ ,  $1265$ ,  $1065$ , and  $972\text{ cm}^{-1}$  であった。このスペクトルはいくつかのピークを除いてエライジン酸 (Fig. 3b) のスペクトルとよく似ていた。



**Fig. 3 Raman spectra of (a) oleic and (b) elaidic acids.**

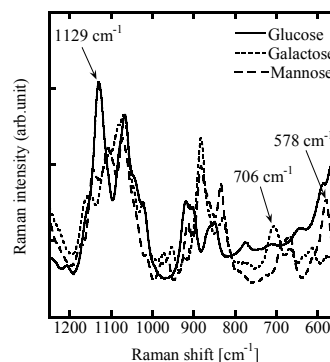
種々の既知濃度の試料のスペクトルを二階微分し、多変量解析の PLS 回帰を用いて、実際の濃度に対する予想値が一致するようなモデルを作った (Figure 4 の黒丸と白丸)。そのモデルを使って定量した結果は、実際の濃度とよく一致していることが示された。(Figure 4 の三角の記号)



**Fig. 4 PLS calibration curves.**

### (3) 糖

糖の構造による振動準位の違いを知るためにラマンスペクトルを測定した。Figure 5 にグルコース、ガラクトースおよびマンノースのラマンスペクトルを示す。



**Fig. 5 Raman spectra of glucose, galactose, and Mannose.**

ヒドロキシ基が異なるだけで大きなスペクトル変化が観測された。各糖固有のピーク (グルコース、ガラクトースおよびマンノースはそれぞれ、 $1129$ ,  $578$ ,  $706\text{ cm}^{-1}$ ) を用いて検量線を作成したところ濃度に対してラマン強度比は比例することが分かった。

### (4) スイカ中のシトルリンの定量

近年、食品廃棄物の量が増加し、大きな問題になってきている。リサイクルの方法として、堆肥化が最も行われているが、もっと付加価値のあるものにすることができれば、さらにリサイクルを進められると考えられる。そのため種々の有用成分を廃棄物から抽出する試みがなされてきた。本研究では、生命活動に有用なアミノ酸を抽出し、再利用しようと考えた。本実験で注目したアミノ酸は、スイカの果皮に含まれている *L*-シトルリンである。アミノ酸を廃棄物から抽出する際、抽出過程で連続的な濃度管理が必要なため、高含水

中で、その場測定が可能なラマン分光法を用いて定量分析を試みた。

Figure 6 にシトルリンのラマンスペクトルを示す。

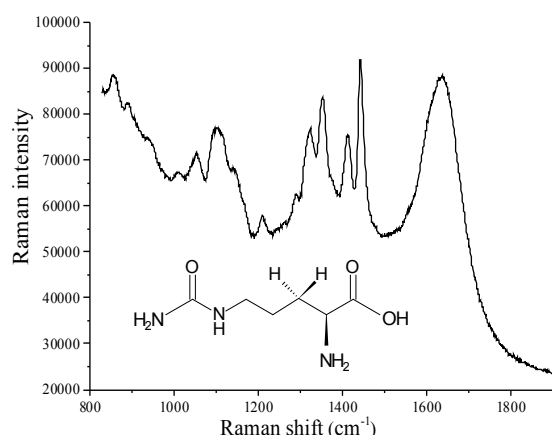


Fig. 6 Raman spectrum of *L*-citrulline.

いくつかのピークが現れているが、最も強度の大きなピーク ( $1443\text{ cm}^{-1}$ ) を用いて、定量することにした。これはシトルリンの H-C-H の変角振動と帰属された。一方、 $1640\text{ cm}^{-1}$  にブロードに現れているピークは水の変角振動と帰属された。希薄溶液では、水の濃度は一定と考えられるので、このピーク強度に対するシトルリンのピーク強度を求めて、定量を行った。濃度に対して、ラマン強度比をプロットしたところ、非常に良い直線関係が得られた。この検量線を用いて、スイカから抽出されたシトルリンの濃度を決定したところ  $2.231 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$  と求められた。同じ試料を高速液体クロマトグラフィで定量したところ  $2.255 \times 10^{-2}\text{ mol/L}$  となり二つの方法で求めた濃度はよく一致した。このことから、ラマン分光法は食品から抽出される有用成分の定量に利用できることが示された。

#### (5) がんと通常細胞におけるラマンスペクトルの違い

がんは 通常の細胞から発生した増殖を制御できない異常な細胞である。そこで、通常細胞と異常細胞の間で、どのような構造変化が起こるか興味をもった。この情報はがんの早期発見や治療に大いに役に立つと考えられる。本研究では通常細胞とがん細胞の組織片のラマンスペクトルを測定し、ピーク位置の違いや強度の違いについて調べた。

通常細胞とがん細胞は Bio-Chain 社製のヒト成人正常組織切片スライドおよびヒト成人腫瘍組織のパラフィン組織切片スライドを用いた。パラフィンをキシレンで除去したのち、ラマンスペクトルを測定した。

Figure 7 に通常細胞とがん細胞のラマンスペク

トルを示す。通常細胞 (Normal) は黒線で、がん細胞 (Tumor) は赤線で表している。

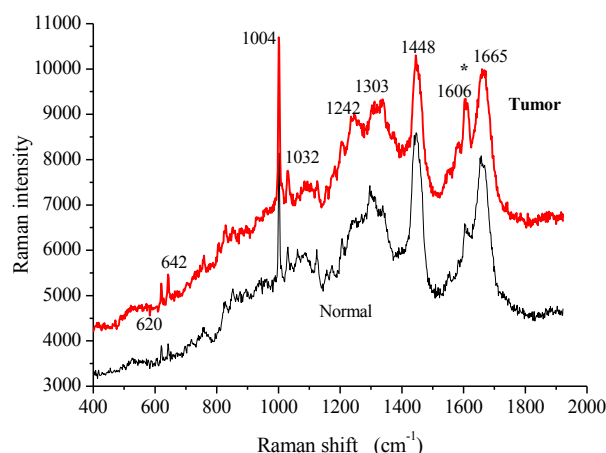


Fig. 7 Raman spectra of normal and tumor tissues.

一見すると、これら二つのスペクトルの差はあまりないように見える。特にがんになると新たに現れてくるピークは観測されなかった。しかしながら、 $1606\text{ cm}^{-1}$  のバンドの強度ががん細胞の方が通常細胞よりかなり大きくなっていることが見てとれる。

これらのスペクトルは組織の 1 点で測定したスペクトルであるので、たまたま強度に差が出た可能性もある。そこで次に各組織の 30 点の箇所

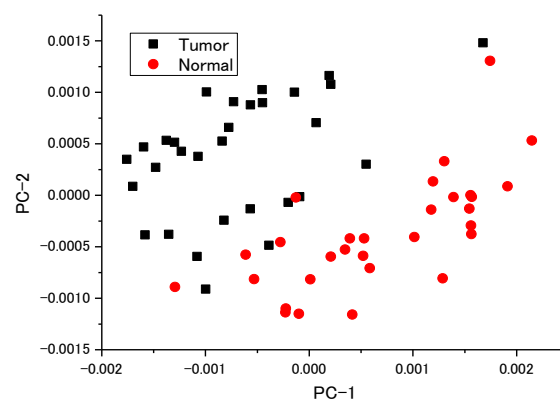


Figure 8 Score plot for PC1 vs PC2.

Figure 8 に主成分 1 に対する主成分 2 をプロットしたスコアプロットを示す。赤丸で表した通常細胞とがん細胞 (黒四角) を比べると、主成分 1 (PC1) の大きい方が赤丸が多く、PC2 の大きい方に黒四角が多いのが見てとれる。これは通常細胞は主成分 1 に、がん細胞は主成分 2 に関係しているといえる。そこで、Figure 9 に主成分 1 および 2 のローディングプロットを示す。

主成分 1 のローディングプロットは、主成分 1 に関連するスペクトルを示している。主成分 2 のローディングプロットと主成分 1 を比較する

と Fig. 7 のラマンスペクトルで予想した通り、 $1606\text{ cm}^{-1}$  のバンドの強度が大きく異なることがわかる。これはがん細胞ではこの  $1606\text{ cm}^{-1}$  のバンドが増加していることを示している。また、他に、 $1582\text{ cm}^{-1}$ ,  $1340\text{ cm}^{-1}$ ,  $1000\text{ cm}^{-1}$  のバンドが増加し、 $1050\text{ cm}^{-1}$ ,  $950\text{ cm}^{-1}$  の領域の強度が下がっていることもわかる。これらの振動の帰属を行い、表 1 に示す。

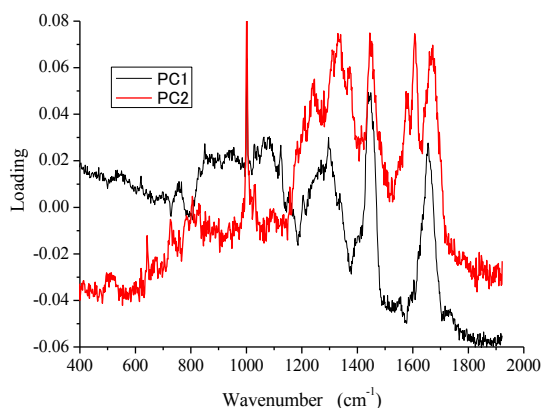


Fig.9 Loading spectra of PC1 and PC2.

Table 1 Assignments of Raman peaks.

| Raman shift<br>( $\text{cm}^{-1}$ ) | Assignments                                               |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1000                                | Symmetric CC aromatic ring breathing                      |
| 1340                                | $\text{CH}_2$ Deformation of Adenine                      |
| 1582                                | C—C stretching, C—H bending                               |
| 1606                                | CO stretching, C=C bending of Phenylalanine or Tryptophan |

まだなぜこれらのピークが増大するかはわからないが、主に芳香族化合物のピークが顕著に現れてくるといいう傾向があることがわかった。

## 平成 29 年度の活動

### 学会発表

#### 1. 分析化学討論会（京都）

小林, 沼田, 田中「ラマン分光法によるリン酸会合体の定量分析」

長鈴, 沼田, 田中「表面増強ラマン散乱を用いた定量分析法の開発」

沼田, 赤間, 田中他「ラマン分光法によるオレイン酸-エライジン酸混合溶液の定量分析」

#### 2. 分析化学年会（東京）

小林, 沼田, 田中「多変量解析を用いた微量分析に向けたラマンスペクトル解析法の開発」

長鈴, 沼田, 田中「表面増強ラマン散乱による増強ピークの時間変化と安定性の追跡」

佐々木, 沼田, 田中「顕微ラマン分光装置を用いたアルコール水溶液の簡易定量分析」

#### 3. 食品科学工学会（日本大学生物資源）

沼田, 月岡, 小林, 田中食品廃棄物中に含まれる有用アミノ酸のラマン分光法による定量分析

### 投稿論文

Numata, Otsuka, Yamagishi, Tanaka, Quantitative Determination of Glycine, Alanine, Aspartic Acid, Glutamic Acid, Phenylalanine, and Tryptophan by Raman Spectroscopy.” *Analytical Letters*, **50**(4) 651-662 (2017).

### 平成 30 年度

#### 1. 分析化学討論会（山口）

赤間, 小林, 河野, 沼田, 田中 「ヒト組織片を用いた通常および腫瘍組織におけるラマンスペクトルの比較」

長鈴, 須田, 沼田, 田中 「金コロイド凝集による SERS ピーク強度変化の追跡」

#### 2. European Congress on Molecular Spectroscopy, Coimbra, Portugal

Numata, *et al.*, “Simultaneous determination of elaidic and oleic acid in their mixed solution.”

#### 3. 分析化学学会年会（仙台）

赤間, 沼田, 田中「胃の組織片を用いた通常および腫瘍組織におけるラマンスペクトルの比較」

長鈴, 沼田, 田中「金コロイドサイズがおよぼす SERS ピーク強度変化」

古澤, 沼田, 田中「ラマン分光法による還元型および酸化型ビタミン C の定量分析」

#### 4. 化学系学協会東北大会（秋田）

赤間, 長鈴, 古澤, 発表 3 件

### 投稿中および準備中論文

(1) Numata, Shinohara, Tanaka, “Quantitative analysis of ethanol-methanol-water ternary solutions using Raman spectroscopy”, *Spectroscopy Letters*, submitted.

(2) Numata\*, Kobayashi, Oonami, Kasai, Hiroyuki Tanaka, “Simultaneous determination of oleic and elaidic acids in their mixed solution by Raman spectroscopy” *J. Molecular Structure*, submitted.

(3) Numata, Tsukioka, Tanaka, “Quantitative analysis of citrulline in watermelon rind by Raman spectroscopy”, *Food Control*, 準備中