

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）

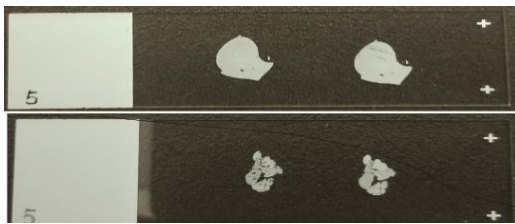
我々のグループでは疾病関連物質の定量分析をラマン分光法で行うことを目標としている。これまでの研究で、アミノ酸¹⁾や脂質、糖のラマン強度比が濃度に比例することを見いだした。そこで、通常細胞とガン細胞のラマンスペクトルを比較し、ガン特有のピークを見つけることを目的として実験を行った。

【序論】

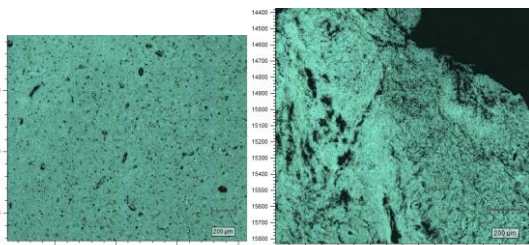
がんは 通常の細胞から発生した増殖を制御できない異常な細胞である。そこで、通常細胞と異常細胞の間で、どのような構造変化が起こるか興味をもった。この情報はがんの早期発見や治療に大いに役に立つと考えられる。本研究では通常細胞とがん細胞の組織片のラマンスペクトルを測定し、ピーク位置の違いや強度の違いについて調べた。

【実験】

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。



組織片 上：通常細胞，下：がん細胞



組織片拡大写真 左：通常細胞，右：がん細胞

ラマンスペクトルの測定には Renishaw 社製 in via Raman microscope を用いた。532 nm の励起光を 50 倍の対物レンズで試料の表面に集光し、1s 間照射した。励起光をフィルターで除去したのち、

ラマン散乱光のみを分光器で分光し、CCD で検出した。これを 30 回繰り返えし、スペクトルを得た。次に各組織 30 点で測定したスペクトルを多変量解析（主成分分析）を用いて解析した。

【結果と考察】

Fig. 1 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。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 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 点の箇所を測定を行い、主成分分析で解析した。

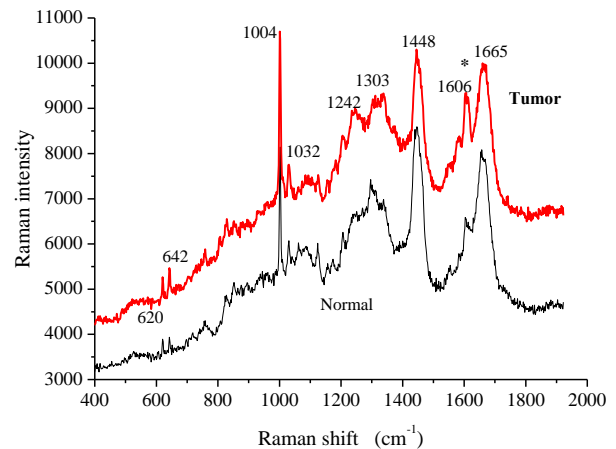


Figure 1 Raman spectra of normal and tumor tissues.

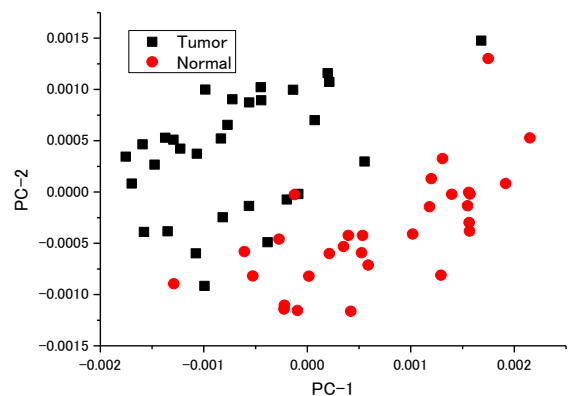


Figure 2 Score plot for PC1 vs PC2.

Figure 2 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 3 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 Figure 1 のラマンスペクトルで予想した通り、 1606 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 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 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , 1000 cm^{-1} のバンドが増加し、 1050 cm^{-1} , 950 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。

Table 1 Assignments of Raman peaks.

Raman shift (cm ⁻¹)	Assignments
1000	Symmetric CC aromatic ring breathing
1340	CH ₂ Deformation of Adenine
1582	C—C stretching, C—H bending
1606	CO stretching, C=C bending of Phenylalanine or Tryptophan

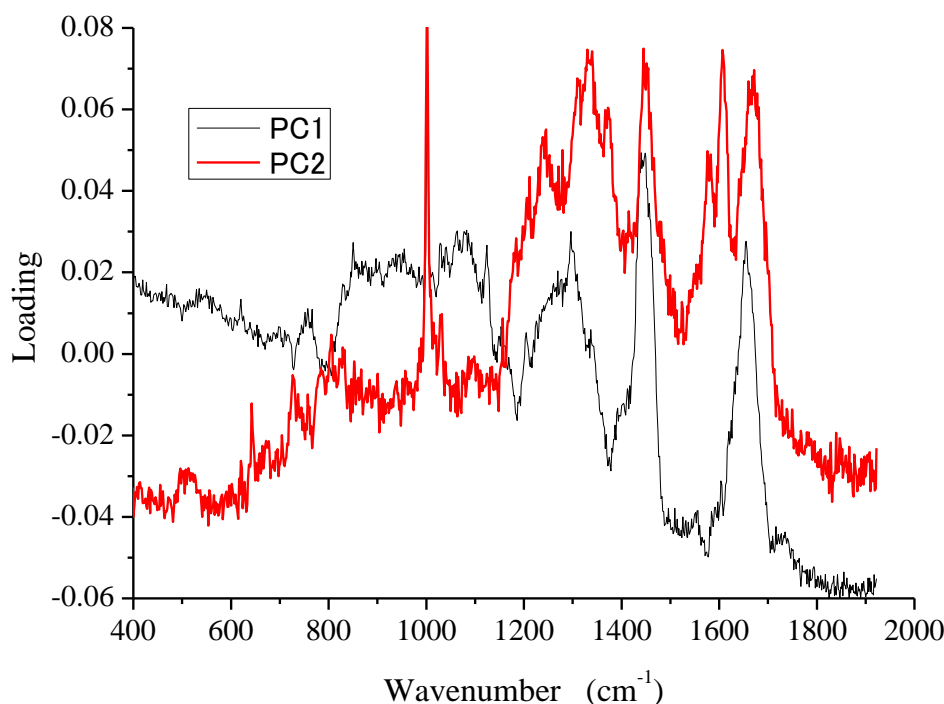


Figure 3 Loading spectra of PC1 and PC2.

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

分析化学討論会

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」
分析化学年会

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」

食品科学工学会

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).