

顕微レーザーラマン分光分析装置 LabRam による バイオサンプル分析

Analysis of Biosamples Using the “LabRam” Laser Raman Spectroscopy System

横山政昭* , 田村典洋**

* 株式会社堀場ジョバンイボン ** 明海大学

生体サンプルを乾燥させることなく測定できるラマン分光分析はバイオの分野でも注目されていた。しかし、今までの装置は測定テクニックが煩雑で、研究者からは敬遠されてきた。顕微レーザーラマン分光分析装置LabRamは、こうしたラマン分光分析に対する多くの研究者のニーズに応え、必要以上の波数分解能・低波数測定能を抑え、迅速・簡便・高感度を実現した顕微専用ラマン装置である。ここでは、ホリバグループのひとつであるジョバンイボン社(フランス)製の顕微レーザーラマン分光分析装置LabRamを用いた測定例を紹介し、バイオサンプルに対するラマン測定の有用性を述べる。

Although Raman spectroscopic analysis has attracted attention in biological fields because of its ability to measure biosamples without drying them, the complexity of the measurement technique required by previous instruments has prevented this method from coming into wide use among researchers. Responding to the needs of many researchers for convenient Raman spectroscopic analysis, the LabRam laser Raman spectroscopy system eliminates unnecessary resolution wave number and low wave number measurement to achieve a quick, convenient, high-sensitivity Raman system. In this article I would like to present an example of measurement using the LabRam laser Raman spectroscopy system, which is manufactured by Jobin Yvon S. A., and discuss the effectiveness of Raman spectroscopy in measuring biosamples.

1

はじめに

物質の組成や化学構造を分析する汎用法として、赤外線吸収分光分析(IR分光分析)とラマン分光分析が一般的である。いずれも化学結合の振動エネルギー状態を測定する手法であるが、パソコンの普及した今日ではフーリエ変換赤外分光分析(FTIR)が最も身近な化合物(とくに有機物)の機器分析法になっている。しかし、IR分光分析は水やガラスの赤外線吸収による影響が強いため、バイオ分野の分析(とくに *in vivo* 分析)には制限がある。一方、ラマン分光分析は励起光および測定光(ラマン散乱光)としてこれらの妨害が少ない可視光を使えるため、バイオの分析に有効である。

しかし従来のラマン分光分析装置は微弱なラマン散乱を捕らえるため、装置が複雑で測定に長時間を要するなど問

題が多かった。また、微弱なラマン散乱を捕らえ易くするため、励起エネルギーを強くすると、サンプルへのダメージが大きくなるという欠点に加え、蛍光の強いサンプルの場合は、肝心のラマン散乱が確認しにくいという問題もあり、バイオ分野には十分に普及していない。

ホリバグループのひとつであるジョバンイボン社(フランス)では、最近のレーザー技術やCCD検出器を駆使して、より少ない照射での高感度・短時間測定を実現した顕微レーザーラマン分光分析装置LabRamを製品化した。本装置は、ラマン分光分析になじみの薄い研究者・技術者でも容易に使いこなせるように設計されており、バイオの分野における基本的な機器分析装置の一つとして注目されている。

2

バイオ分野の実測例

2.1 ゆで卵の白身の分析

生体サンプルのラマン分光分析とIR分光分析における水分の影響を比較する場合、両者の差は、ゆで卵の各部位を測定した例を示すとわかりやすい。

ゆで卵の薄皮を LabRam とホリバ製 FTIR (FT-700) で分析すると、いずれもたんぱく質に由来するピークを持つスペクトルが得られる(図1・ および図2・)。

黄身を同様に2種類の分析方法で測定すると、たんぱく質と各種色素等のピークが加算されたやや複雑なスペクトルが得られる(図1・ および図2・)。2つのスペクトルを比較するといずれの測定方法にも共通するピークをいくつか確認でき、どちらの測定方法も同じ化学結合のエネルギーを測定していることが示唆される。

ところが、白身を測定すると、2つの測定方法による結果には明らかな違いが生ずる。ラマンスペクトルはたんぱく質由来のピークを示し、薄皮のラマンスペクトルと類似している(図1・)。それに対しFTIRで測定すると、得られるスペクトルはほとんど水のスペクトルと同じで、 1600cm^{-1} 付近のたんぱく質に由来するピークが隠蔽されてしまう(図2・)。ゆで卵の白身は多量に水分を含んだたんぱく質であり、このような状態でのたんぱく質を測定することが目的の場合は、水の影響を受けにくいラマン分光分析が目的の測定に適している。反対に有機物中に含まれる水を確認する場合などはFTIRの方が目的に適合している。

バイオサンプルの多くは、生命活動に由来したもので、乾燥させると変質する物が多く、湿潤環境下での測定が望まれる。水分を含んだ状態で、水分以外の物質の情報を得易いラマン分光分析は多くのバイオサンプル測定に適した分析方法である。

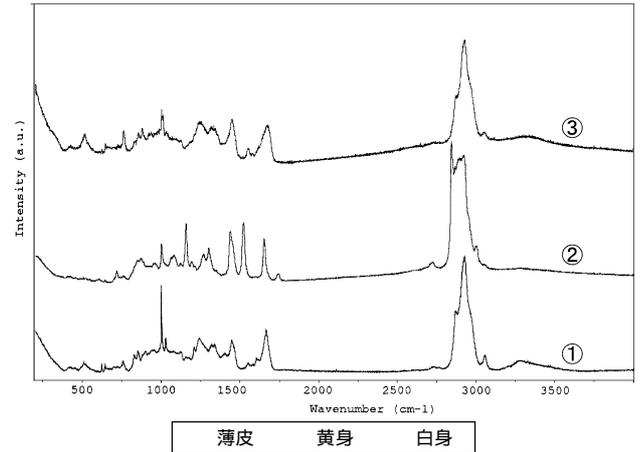


図1 ゆで卵各部位のラマンスペクトル

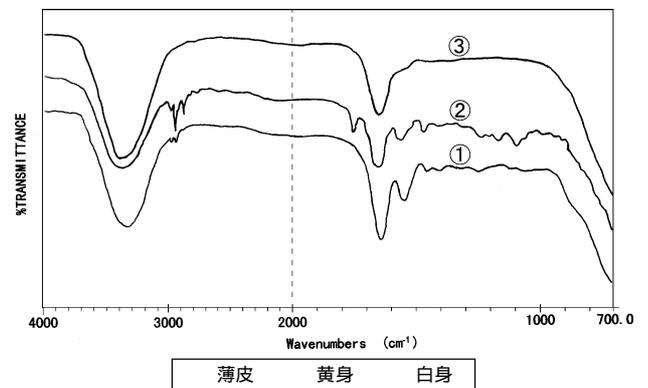


図2 ゆで卵各部位のIRスペクトル

2.2 子供用栄養補助食品中の鉄化合物の形態分布の測定

顕微レーザーラマン分光分析装置 LabRam を用いて、湿潤状態における鉄化合物の形態分布を測定した例がある。これは子供の鉄栄養補助食品に含まれている鉄の酸化物の形態分布をラマン分析(マッピング測定)で調べたものである。鉄の酸化物は一般的に、Hematite(Fe_2O_3] 三酸化鉄] と Magnetite(Fe_3O_4] 四酸化鉄] の2種類の存在形態が知られており、形態によって溶解度や体内吸収率、体内転流速度などが変わってくる可能性がある。そこで、子供用栄養補助食品中の鉄酸化物の形態分布を LabRam で測定した。

Hematite は 400cm^{-1} に、Magnetite は 670cm^{-1} にそれぞれ特徴的なピークを有し、両者に共通して 190cm^{-1} にピークが存在する。これらをそれぞれマッピングすることで鉄酸化物の2種類の形態がどのように分布しているか把握することができた(図3)。さらにこの状態から、消化酵素の添加・生体内環境変化模試(pH, 酸化還元電位等)など、研究の目的に応じて追求していくことも可能であろう。

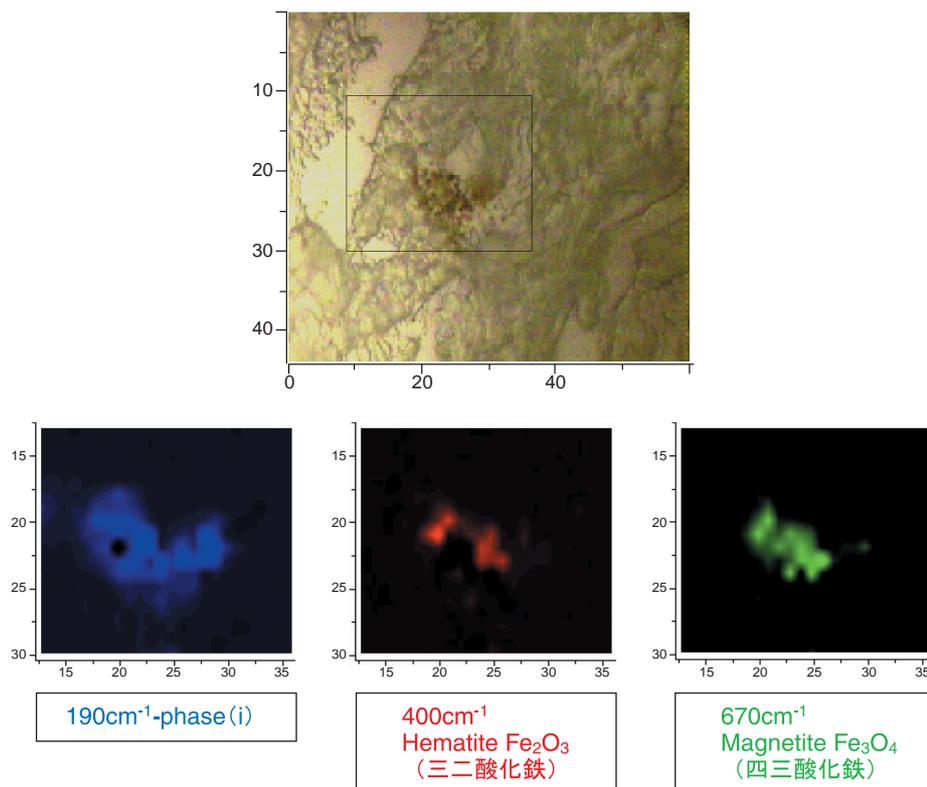


図3 LaRam による子供用鉄補給栄養補助食品の鉄酸化状態の測定例

3

バイオサンプルに有効な測定手法

3.1 効果的な熱発散

ラマン分光分析においては、励起光のエネルギーが高いためサンプルによってはダメージを受ける恐れがある。ダメージは主に照射によるサンプルの急激な温度上昇が原因であり、うまく熱を逃がすことができればほとんどの問題は解決する。とくにバイオサンプルでは、「サンプルを水中に入れて測定する」「サンプルが充分湿潤な状態で測定する」など水を利用した方法が有効である。乾燥したサンプルでも水に浸潤させて測定すると多くの場合、サンプルのダメージを軽減できる。

また、サンプルをカバーガラスのような薄いガラスで覆って測定すると、水分の蒸発を防ぐ。ガラスにより照射エネルギーが若干弱くなる。熱がガラスを伝わって逃げ易くなる。といったサンプルのダメージを抑える効果が期待される。

このように水・ガラス越しの測定が可能というラマン分光分析の最大の特徴を利用して、サンプルのダメージを防ぐことができる。

3.2 励起光の波長選択による蛍光影響の除去

蛍光による妨害もラマン測定の問題の一つである。バイオサンプルの場合、乾燥することによって蛍光が強くなる物質も多く、湿潤状態で測定することで蛍光妨害の回避になることもある。ラマン分光分析ではサンプルから発する蛍光により、ラマンピークが隠蔽されることがある。とくにバイオサンプルでは、乾燥させることで蛍光の影響を強くしてしまう場合が少なくない。

蛍光妨害の回避の最も有効な方法は、励起光の波長を変える方法である。ラマンスペクトルは励起光とラマン散乱光のエネルギー(波数)の差で求められるため、励起波長をシフトすればラマン散乱光の波長もシフトする。しかし、蛍光は励起波長が変化しても蛍光波長に変化はない。したがって、ラマン散乱光の波長が蛍光波長とずれるように励起光の波長を切り替えて測定すると、蛍光による妨害影響を取り除くことができる。

図4に緑茶のペットボトルのラマンスペクトルを示す。これを514nmの緑色のレーザーで励起してラマンスペクトルを測定すると、緑色の蛍光に隠れてしまいPET固有のラマンピークは確認しにくい(図4・①)。一方、785nmの近赤外線での励起した場合は、きれいな緑色PET固有のラマンスペクトル(PETと色素等添加物のピーク)が得られる(図4・②)。

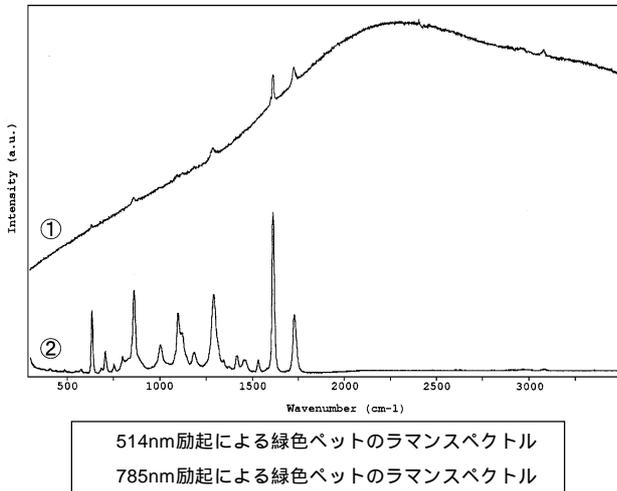


図4 緑色ペットボトルのラマン分析の際の励起光切り替えによる蛍光影響の削減効果

このように、ジヨバンイボン社製の顕微レーザーラマン分光分析装置 LabRam は2種類の励起波長を簡単に切り替えることができるシステムになっているため、蛍光を発生するサンプルへの対応も迅速簡便である。さらにこの機能は、ラディエーションダメージの影響を受けやすいバイオサンプルの測定の際に、励起光を長波長側に切り替えることによりダメージを軽減化する効果も期待できる。

4

おわりに

ラマン分光分析がバイオサンプルに有効なことは比較的早くから知られていたが、実際に研究開発の現場で広く使われるまでには至っていない。近年、レーザーや検出器の技術の向上にともない、ラマン測定装置の性能は著しく改良されてきているが、バイオ分野におけるラマン分光分析の有用性が十分に認識されているとはいえない。本稿がラマン分光分析普及の一助になることを願っている。

参考文献

- [1] 尾崎幸洋 編集
「実用分光法シリーズ ラマン分光法」
1998年、(株)アイピーシー発行
- [2] 浜口宏夫・平川睦子 編集
「日本分光学会測定法シリーズ 17 ラマン分光法」
1988年、(株)学会出版センター発行



横山政昭

Masaaki YOKOYAMA

株式会社堀場ジヨバンイボン
アプリケーション・エンジニア



田村典洋

Norihiro TAMURA, M.D

明海大学
歯学部
歯学博士