

## ラマン分光法による白血球中の脂質動態解析

(東大院理\*, NCTU 分子科学研究所\*\*)

○安藤正浩\*, 小野木智加朗\*, Kaliaperumal Venkatesh\*, Shraeddha Tiwari\*, 濱口宏夫\*\*

【序】ラマン分光法は、前処理を必要とせず、低侵襲で分子レベルの解析を行うことができることから、近年では医用分野への応用が進んでいる。本研究では、顕微ラマン分光法を白血球の分子レベル解析に応用し、臨床診断応用への足がかりを得ることを目的とした。白血球は、血液を構成する細胞の一つであり、免疫機能に深く関わっている。白血球の状態を知ることで、人体の健康状態や炎症反応についての情報を得ることが可能である。顕微ラマン分光法を用いた無染色・分子レベルの解析により、脂質、タンパク質、核酸、ヘム酵素、色素などの存在量、空間分布を得ることで、個々の白血球に関する詳細な情報を得ることが可能となるものと期待される。本研究では、白血球の活性化・炎症反応において重要な役割を担う脂質分子について、その分子構造、空間分布についての詳細な情報を得ることが可能であることを示す。

【実験】試料には、末梢血から採取した白血球を用い、ガラスボトムディッシュ上に接着した細胞を観測した。ラマン分光測定には、632.8 nm 励起共焦点顕微ラマン分光装置(対物レンズ x100 / NA 1.35, 空間分解能 面内 0.3  $\mu\text{m}$  奥行き 2  $\mu\text{m}$ )を用い、0.5  $\mu\text{m}$  間隔で試料ステージを移動させることでマッピング測定を行った。励起光強度は 18 mW, 各点の露光時間は 0.5 – 1 秒である。各測定点から得られるラマンスペクトルは、複数の構成分子種の混合物のスペクトルとして得られる。そこでデータ解析では、多変量解析のひとつである Multivariate Curve Resolution (MCR) を用いることで、スペクトルを分離し、各成分の空間分布情報を得ることを試みた。

【結果と考察】まず、白血球全体の 50 – 70 % を占める好中球から得られた代表的なラマンスペクトルを図 1 に示す。細胞質部分のスペクトルには、タンパク質に帰属されるバンド (1003, 1449, 1660  $\text{cm}^{-1}$ ) に加え、753, 1116, 1330, 1541, 1580, 1611  $\text{cm}^{-1}$  などに鋭いラマンバンドが多数検出された。好中球はミエロペルオキシダーゼ(MPO)と呼ばれるヘム酵素を細胞質中に有しており、これらが共鳴ラマン効果により検出されたものと考えられる[1]。MPO などのヘム酵素は、炎症反応の際に重要な役割を果たす分子であり、白血球の状態を知る上で重要なマーカーとなることが期待される。一方、核から得られたラ

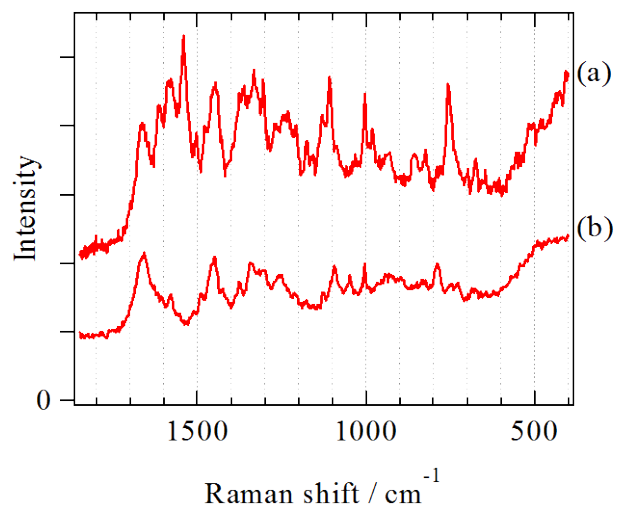


図 1. 好中球のラマンスペクトル (a) 細胞質, (b) 核

マンスペクトル (図 1(b)) からは、タンパク質のバンドに加えて、核酸に由来するバンド ( $788, 1580 \text{ cm}^{-1}$ ) がみられる。そしてこれらのラマンバンドから、各分子の細胞内分布が明瞭に可視化された (図 2)。

さらに、本手法を用いることで、これまで *in vivo* 解析が困難であった脂質についての情報を得ることが可能となる。幾つかの白血球からは、脂質分子の局在が検出された。全測定点から得られたスペクトルを MCR により多変量解析することにより、明瞭な脂質分子のスペクトル、及びその空間分布情報を抽出することができ (図 3)、脂質分子が細胞質内で、局所的に高濃度に分布している様子が可視化される。さらに、脂質成分のスペクトルは図 3 に示す通り、 $1658 \text{ cm}^{-1}$  の C=C 伸縮振動に帰属されるバンドが強く検出されている。不飽和結合を持つ代表的な脂質分子 (オレイン酸、リノレン酸、アラキドン酸、不飽和結合は各々 1, 3, 4 個) のスペクトルと比較すると (図 4)、不飽和結合を分子内に 4 つ持つアラキドン酸のスペクトルとよく類似していることが分かる。すなわち、細胞内において、高い不飽和度を持つ脂質分子を多量に含む脂質顆粒が存在することが確認された。アラキドン酸に代表されるエイコサノイドは、脂質メディエーターとして、白血球の炎症反応において重要な役割を担う分子である。これらの脂質顆粒は、白血球の活性化・炎症反応において様々な役割を果たすことも知られている[2]。ラマン分光法による白血球中の脂質解析は、基礎研究、臨床応用両面において、他の手法の追随を許さない基盤的手法となるものと期待される。

#### 【参考文献】

- [1] S. Brogioni, A. Feis, M. P. Marzocchi, M. Zederbauer, P. G. Furtmuller, C. Obinger, and G. Smulevich, *J. Raman Spectrosc.* **37**, 263 (2006).
- [2] P. T. Bozza, K. G. Magalhaes, and P. F. Weller, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1791**, 540 (2009)

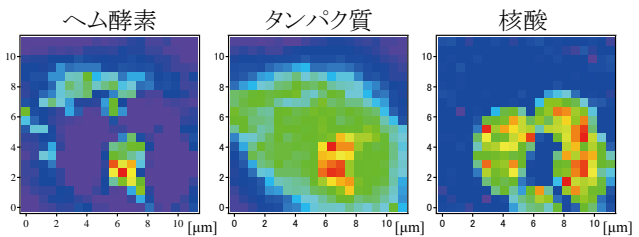


図 2. 好中球のラマンマッピング画像

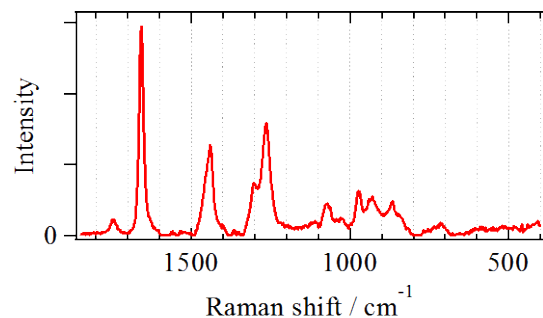
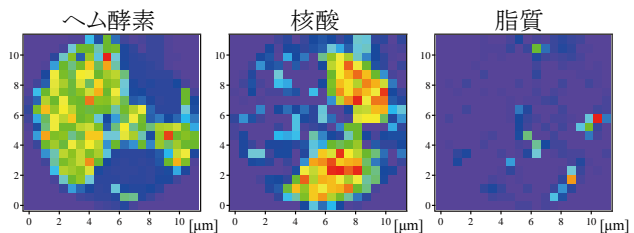


図 3. 脂質の局在が見られた白血球のラマンイメージ、及び脂質成分のスペクトル

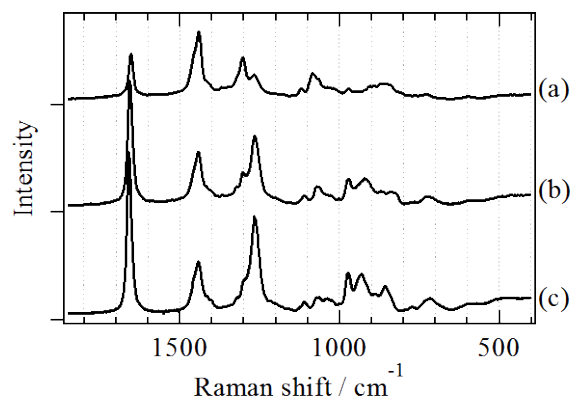


図 4. 脂質のラマンスペクトル (a)オレイン酸, (b)リノレン酸, (c)アラキドン酸