

生きた植物組織からの共鳴ラマンスペクトルの顕微観測

(顕微ラマン散乱/共鳴ラマン散乱/生きた植物組織)

田 口 功*

Resonance Raman Spectra from Intact Plant Tissues
by Micro Raman Scattering

(micro Raman scattering/resonance Raman scattering/intact plant tissues)

Isao TAGUCHI*

(Received September 8, 1993)

Micro Raman scattering has been performed with high resolution ($\sim 3\text{cm}^{-1}$) on intact plant tissues such as spinach, mandarin orange and apple. The incident light beam of 488.0 nm from an argon-ion laser is focused into a spot with the size of $1\sim 5\ \mu\text{m}$ on the live samples. The obtained Raman spectra are of high quality and contain several resonance-enhanced peaks caused by lattice vibrations of β -carotene in the frequency range of $700\sim 1800\text{cm}^{-1}$. The observed peak frequencies are found to be independent of the tissues within the experimental resolution. These experiments with high resolution demonstrate that it is possible to make a quantitative comparison of micro Raman spectra among various points in a tissue or between different tissues.

1. 緒 言

生物の組織はいろいろな物質で構成される複雑な系である。このような系においては、種々の分子に対応して多くの格子振動モードが存在するので、分離精製してからラマンスペクトルを観測することになる。ところが、細胞中に何かの色素が含まれている場合、ラマン散乱の励起波長を色素分子の光吸収バンドの波長に合わせてやると共鳴ラマン効果が起こる。それにより、特定の分子の構造に関する情報を選択的に、また濃度が低い場合でも得ることができる。そのような実験は、最初、ニンジンやトマトについて、照射レーザービームのスポットが大きい(数mm径)通常のラマン散乱実験によって行われた^{1,2)}。

近年、顕微鏡を用いてレーザーラマン散乱を行う技術が開発された³⁾。顕微ラマン散乱測定法によれば、 μm のスケールの領域からラマンスペクトルを測定することができ、生物組織の微小分析が可能となる。植物への応用例として、ピーマンの細胞⁴⁾や木材繊維⁵⁾

を顕微ラマン散乱法で見たことが報告されている。それらの例示的報告では、波数の分解能が低く、組織中での異なる点間あるいは組織間でラマンピーク振動数の定量的な比較を行うことが難しい。

本論文では、他の植物の生の組織について波数分解能を上げた顕微ラマン散乱を行い、顕微ラマン散乱の可能性について検討する。

2. 実験方法と試料

顕微ラマン測定装置は、ラマン散乱装置と光学顕微鏡とを組み合わせたものである。顕微鏡部分を中心にした測定原理を図1に示す。レーザー入射光は、対物レンズを通りビーム径を絞られて試料にあたる。本実験で使用した顕微ラマン測定装置(JASCO社製R-MPS21)の場合、照射ビーム径は対物レンズの倍率によって変わり、対物レンズの倍率 $\times 20$, $\times 50$, $\times 100$ に対応してそれぞれ約5, 2, 1 μm である。

試料からの強いレーザース散乱光と微弱なラマン散乱光は、ともに対物レンズを通った後、分光器を経由し

*物理学教室 Department of Physics

本論文を謹んで故黒川正巳教授に捧げる。

てフォトマルで検知される。したがって、散乱配置としては完全な後方散乱となる。

分光器を含むラマン散乱測定の本体部分には、JASCO製 NR-1100 を使用した。入射光源としてはアルゴンイオンレーザー (Spectra-Physics 社, モデル 2016) の 488.0-nm ラインを用いた。レーザーによる試料損傷を防ぐため、照射パワーがアルゴンレーザーの出口で約 20 mW 以下になるように調整した。測定装置の分解能は $3\sim 4\text{ cm}^{-1}$ とし、従来の報告 ($\text{約 } 10\text{ cm}^{-1}$)⁴⁾ に比べてはるかに高分解能にした。

試料は新鮮なホウレンソウの葉、ミカンの果肉およびリンゴの果肉で、いずれも特別な処理をしないで、そのまま使用した。測定はすべて室温において行った。

測定データに関しては、RS232C によるパーソナルコンピュータ (NEC, PC9801vm) への転送のためのプログラムを独自に開発して、データのコンピュータ処理が自由に行えるようにした。

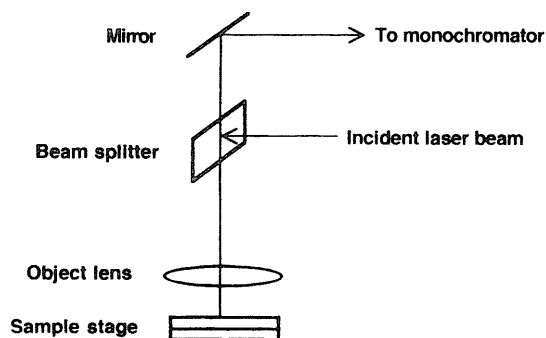


Fig.1. Basic principle of micro Raman scattering.

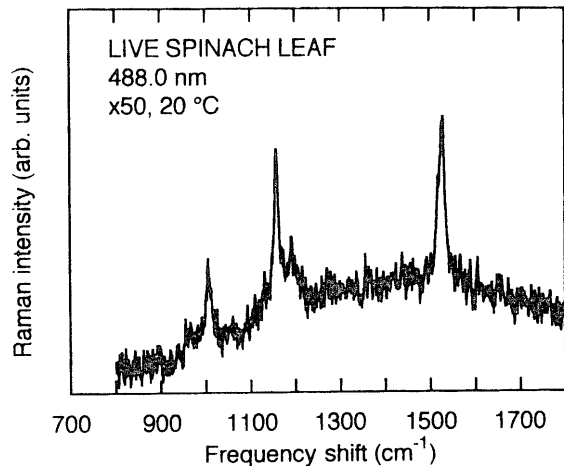


Fig.2. Micro Raman spectra from a green part in a live spinach leaf.

3. 実験結果と考察

図2はホウレンソウの葉の顕微ラマンスペクトルを表す。照射レーザーのスポットは葉の緑色の部分にあり、直径 $2.5\ \mu\text{m}$ である。その位置は写真 (図3) の中央部で白く写っている箇所である。得られたラマンスペクトルは、従来の報告⁴⁾ に比べて SN 比、分解能ともよい。波数 1158 cm^{-1} と 1526 cm^{-1} の位置に大きなピークが、また波数 1006 cm^{-1} と 1189 cm^{-1} に小さなピークが現れている。さらに、 $960\sim 970\text{ cm}^{-1}$ 付近に弱いピークが見える。なお、対物レンズの倍率を $\times 100$ にしたときにも、同様のスペクトルが得られた。

ホウレンソウの葉には、所々黄色い斑点の部分がある。図4は、その部分からとったラマンスペクトルである。図2で見えていた5本のシャープなピークが消え、でこぼこしたバックグラウンドが残っている。

ミカンの果肉 (粒) の顕微ラマンスペクトルを図5に示す。照射レーザーのスポット径は約 $5\ \mu\text{m}$ である。4本のラインが観測される。

図6は、リンゴの果肉の部分に微小スポットをあてて得られた顕微ラマンスペクトルを表す。バックグラウンドの山に重なって、二つのピークが波数 1005 cm^{-1} と 1159 cm^{-1} の位置に見える。図7はリンゴの赤い皮からの顕微ラマンスペクトルを表す。強度が弱い、3本のピークが見える。

これらの植物の生の微小な組織から観測されたラマンピークの振動数を表1にまとめた。表1には、比較のために、通常のマクロなラマン散乱によって得られたニンジンとトマト、および β -カロチンの n -ヘキサン溶液からの共鳴ラマンピークの振動数がのせてあ

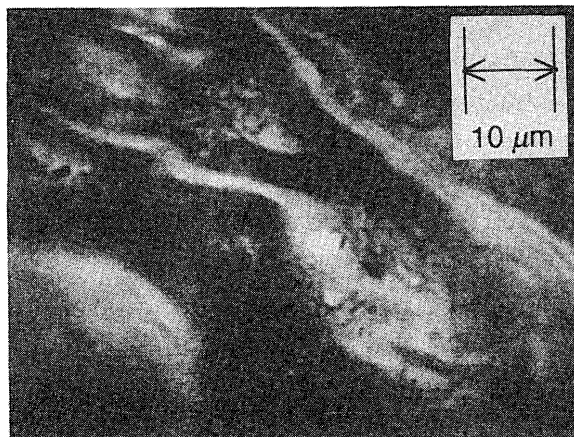


Fig.3. Photograph of a spinach leaf irradiated by an incident laser beam. The irradiated part is represented as a white circle of radius $\sim 2.5\ \mu\text{m}$.

り、ニンジンとトマトに関する共鳴ラマンピークが β -カロチンに由来することがわかる¹⁾。顕微ラマン散乱によって得られたピークの振動数は、分解能の範囲で、それらの値とよく一致している。

β -カロチンは、波長380~520nmの範囲に非局在性 π 電子による光吸収バンドをもつ。本実験で用いた照射レーザーの波長はその範囲に含まれており、ラマンピークの強度が共鳴増大したものと考えられる。

表1で、ラマンピークの振動数は試料の種類にほとんど依存していない。このことは、カロチノイドの共鳴ラマンスペクトルに対しては共役鎖の格子振動が主な寄与をなすことを意味する。なお、無限長のポリビニレン鎖の面内振動に関するモデル計算⁶⁾から、1500 cm^{-1} 付近のモードはC=C結合のかたさに依存すること、1100~1200 cm^{-1} のバンドはC-CとC=Cの伸縮モードがC-C-H変角モードと混合して生じたモードであることが示されている。

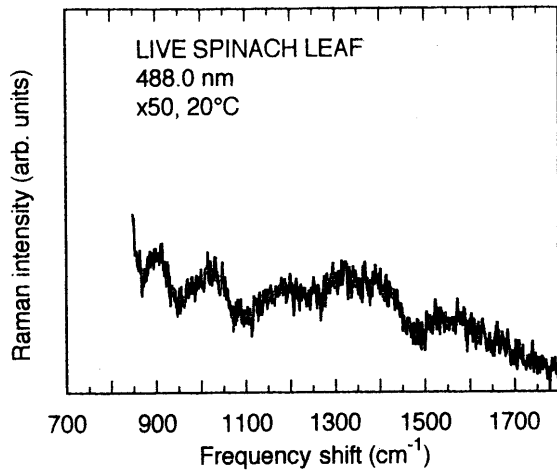


Fig.4. Micro Raman spectra from a yellow spot in a live spinach leaf.

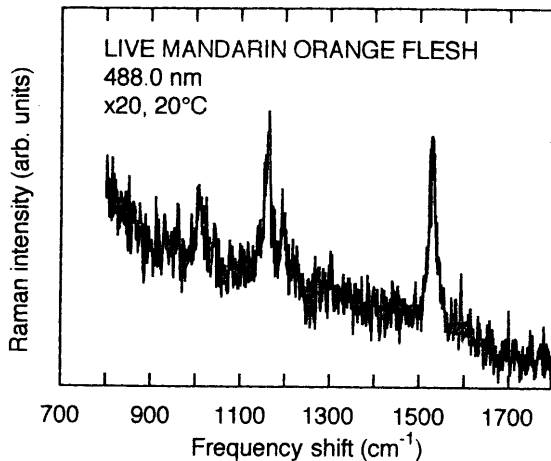


Fig.5. Micro Raman spectra from live mandarin flesh.

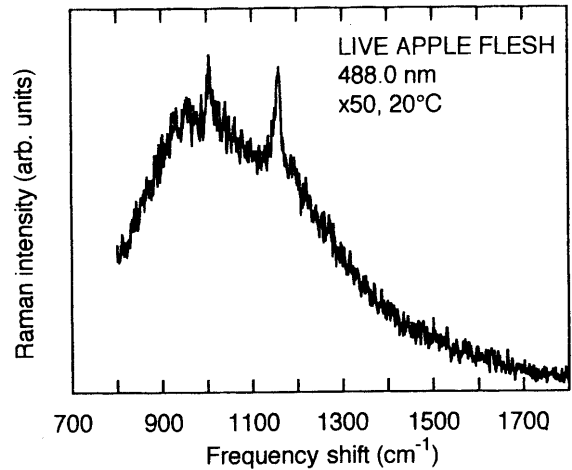


Fig.6. Micro Raman spectra from live apple flesh.

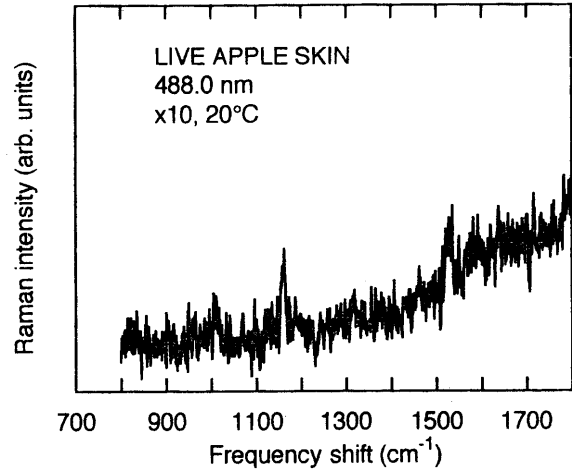


Fig.7. Micro Raman spectra from live apple-skin.

Table I. Frequencies of the observed resonance-enhanced Raman peaks from intact plant tissues.

Sample	Frequency (cm^{-1})				
Spinach leaf ^{a)}	963	1006	1158	1189	1526
Apple flesh ^{a)}		1005	1159		
Apple skin ^{a)}		1007	1159		1527
Mandarin flesh ^{a)}		1007	1159	1195	1527
Carrot root ^{b)}	965	1005	1159		1527
Tomato fruit ^{b)}	963	1007	1158	1198	1523
β -carotene in <i>n</i> -hexane ^{b)}	961	1006	1158	1193	1527

^{a)} Obtained by micro Raman scattering in this work.

^{b)} Obtained by normal Raman scattering.¹⁾

図4でのピークの消失は、ハウレンソウの黄色っぽい斑点部分では β -カロチンが含まれていないか、あるいはその量が極めて少ないことを意味する。斑点部分の細胞は、周囲に比べて正常でないと考えられる。

4. 結 語

生の植物（ハウレンソウ、ミカン、リンゴ）組織について波数の分解能を上げて顕微ラマン散乱を行った。いずれの試料についても、1~5 μ mの微小領域からラマンスペクトルが高分解能で得られた。

観測されたラマンピークについて、それらが組織に含まれる β -カロチンの格子振動モードに由来すること、またピーク強度が共鳴ラマン効果により増大していることが判明した。ピークの振動数は分解能の範囲で、試料依存性を示さなかった。ハウレンソウの場合、微小組織の状態を反映してラマンスペクトルが変化した。

以上の結果から、マクロなラマン散乱と同程度の分解能で、顕微ラマン法を微小組織の分析に使えることが明らかになった。

文 献

- 1) D.Gill, R.G.Kilponen and L.Rimai : Nature **227** (1970) 743.
- 2) L.Rimai, M.E.Heyde and D.Gill : J. Am. Chem. Soc. **95** (1973) 4493.
- 3) M.Delhaye and P.Dhamelin court : J. Raman Spectrosc. **3** (1975) 33.
- 4) R.Cavagnat, F.Cruege and P.V.Huong : Biochimie **63** (1981) 927.
- 5) R.H.Atalla : J. Wood Chem. Technol. **7** (1987) 115.
- 6) F.Inagaki, M.Tasumi and T.Miyazawa : J. Raman Spectrosc. **3** (1975) 335.