

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660178

研究課題名(和文) ラマン分光法を用いた養殖魚介類成分の非侵襲的in vivo定量分析法の開発

研究課題名(英文) Development of noninvasive in vivo quantitative analysis methods of fish and shellfish components using Raman spectroscopy

研究代表者

青木 宙 (Takashi, Aoki)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・招聘研究員

研究者番号：00051805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラマン分光技術は、脂質、タンパク質およびカロテノイド等の検出を迅速かつ簡便に行うことができ、さらに検体を傷つけることなく測定できる。本研究ではこの技術が食品の機能性成分の分析や食品の特徴付けに応用可能であるかどうか評価することを目的とし、ラマン分光法を用いて、市販されているサケの切り身のアスタキサンチン含有量、イカ類のタウリン含有量、さらに、クロマグロに含まれる不飽和脂肪酸の検出を行い、これらの成分含有量の測定を行った。

研究成果の概要(英文)：A new technology employing Raman spectroscopy is attracting attention as a powerful biochemical technique for the detection of beneficial and functional food nutrients, such as proteins, fats and carotenoids. This technique allows for the dynamic characterization of food nutrient substances for the rapid determination of food quality. In this study, using Raman technology, we attempt to detect and measure astaxanthin from salmon fillets, taurine from squid, and unsaturated fatty acids from Bluefin tuna. The results showed that these functional food nutrients were successfully detected and measured using Raman spectroscopy.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：ラマン分光 魚介類 食品成分 アスタキサンチン タウリン 不飽和脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

国民の食の安全・安心に対する関心が高まっている昨今、養殖魚介類の安全確保および品質管理をより高度化するためには、新たなより優れた技術革新が必要であると考えられた。例えば、輸入養殖魚介類に対する迅速な品質の成分分析技術やある特定の有害物質を検出するための技術は、我々国民の健康に直結する問題として早急に対策を立てる必要があった。また、これらの技術には誰でも使用できる簡便さと迅速さが必要であった。申請者らが考案するラマン分光法を用いた技術は、一定の波長の光を物質にあてると入射光とは異なる波長の光となって散乱される。この散乱から得られるラマンスペクトルは、「分子の指紋」とも言われ、分子構造の個性を正確に反映し、多くの物質に関する情報を同時に解析できる優れた技術であると考えた。

2. 研究の目的

従来、養殖魚介類の品質管理には、詳細な成分分析やDNA鑑別等の方法が用いられてきたが、どの方法も時間およびコストが膨大に必要である。ラマン分光技術を用いることで脂質やタンパク質等の成分検出を迅速、簡便かつ非侵襲的に測定できる。申請者らは、ラマン分光技術を利用して養殖魚介類に含まれる様々な機能性成分の測定を試み、この技術を水産物の成分分析および品質管理のための新しい技術として発展させることを目的とした。また、将来的には、水産物の生産加工時にこの技術を導入することで、消費者に対して、より安心・安全な食品の供給が可能となると考えた。

3. 研究の方法

検出の対象となる養殖魚介類は、検出する成分によって次のように異なる。タンパク質および脂質については、サケおよびマグロを用いる。特に、タンパク質のラマンバンドは、筋肉中(可食部位中)の相対的な成分量を定性的な検出をするのに用いた。アスタキサンチンは、数種類のサケ(大西洋サケ、ベニザケ、およびギンザケ等)、タウリンについては養殖魚介類を中心に複数の魚介類を用いた。さらに、不飽和脂肪酸についてはクロマグロの赤身部位(6個)と中トロ部位(5個)の切り身を用いて解析した。例として、図1に今回ラマン分光法を用いた脂質の実験手順を簡単に示した。

1)アスタキサンチン(カロテノイド)の検出および定量方法

本研究では、将来的に加工現場で使いやすいことを想定して、ポータブルラマン分光器を用いた。波長785nm、300mVの強さの光を5秒間、サケやマグロの切り身の測定部位に照

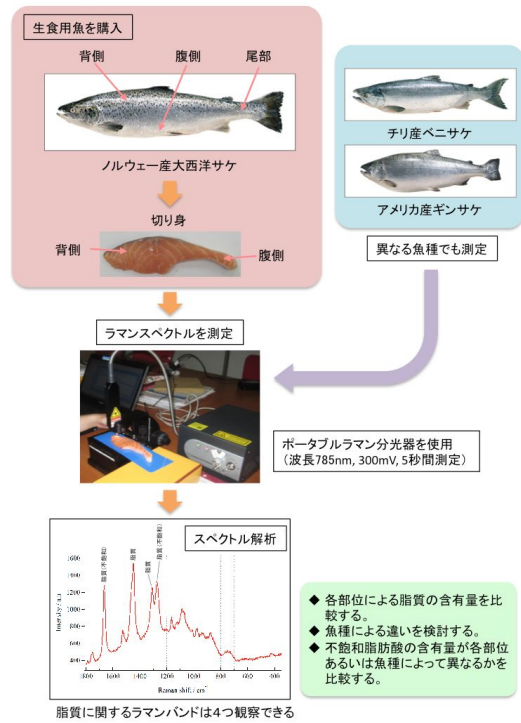


図1. ラマン分光法によるサケ切り身中に含まれる脂質の測定手順

射してラマンスペクトルを検出し、標準精製成分との比較によりタンパク質、アスタキサンチン(カロテノイド)、タウリンおよび不飽和脂肪酸を示すそれぞれのラマンバンドを含むラマンスペクトルを検出し、各成分に特徴的なラマンバンドを特定した。各測定部位について無作為に多数点測定し、平均化したラマンスペクトルを用いて解析・比較する。この結果から、各部位による成分の相対的な量の違いを検討した。次いで、異なる養殖魚種についても同様にラマンスペクトルを解析し、種類による違いを比較・検討した。

2)タウリンの検出および定量方法

上記と同様の方法を用いて、イカ類からのタウリンの検出を試みた。ラマン分光法により測定した成分を定量するため、タウリン標品試料からラマンスペクトルを測定し、検量線を作成することでタウリンの定量を可能とした。また、同一試料を用いて逆相カラムによる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、タウリン含有量の検量線を作成し、ラマン分光法により作成した検量線との相関性を確認した。最終的に得られた定量係数をもとに、他の養殖魚介類に含まれるタウリン含有量を定量した。

3)不飽和脂肪酸の検出方法

ラマン分光法を用いた不飽和脂肪酸の検出には、クロマグロの筋肉部位(赤身部位6個と中トロ部位5個を含む)の切り身を使用した。マグロの切り身から任意に測定点を選び、ラマンスペクトルを取得した。また、ドコサヘキサエン酸(DHA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、アラキドン酸、オレイン酸等の標品からラマンスペクトルを取得し、マグロ試料から得られたスペクトルと

比較した。多変量スペクトル分解を用いて、各不飽和脂肪酸を解析した。さらに、ラマン分光測定に使用した試料と同一の検体から抽出した各不飽和脂肪酸についてガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の定量分析を行い、多変量スペクトル分解のデータと比較した。

4. 研究成果

1) アスタキサンチンの検出および定量

本研究の結果から、アスタキサンチンに帰属されたラマンバンド 1518 cm^{-1} がサケの赤色筋肉部位で確認できた(図2)。その強度は、アスタキサンチン含有量に依存しており、ラ

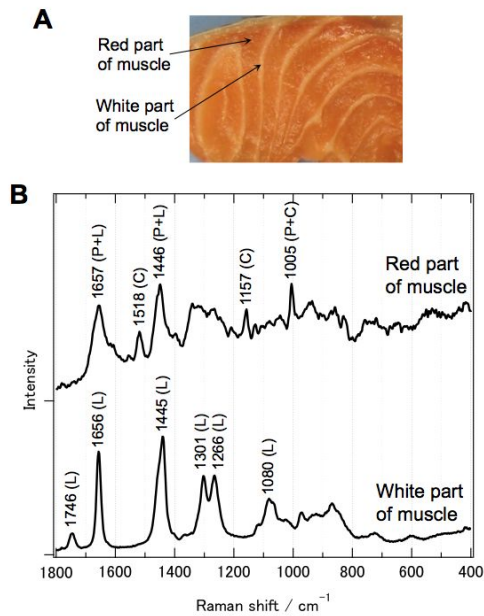


図2. 大西洋サケの筋肉部位から得られたラマンスペクトル。A. 筋肉中の赤色および白色部位の写真。B. 筋肉中の赤色および白色部位から得られたラマンスペクトルと、タンパク質、脂質およびカロテノイドを示す主なラマンバンド。

マン分光法による測定に定量性があると示唆された。また、目視による切り身の赤色の濃さとアスタキサンチン含有量の間に関連性があるかを調べたところ、図3で示すように、筋肉の赤色の濃さに比例して、アスタキサンチン含有量が多いことが示された。本研究における、ラマン分光法を用いたアスタキサンチン測定法を用いることでより簡便、迅速、且つ非侵襲的にサケの筋肉中のアスタキサンチン含有量を測定可能となった。

Species	Concentration (mg/kg)
Atlantic salmon	4.5
Coho salmon	7.0
Sockeye salmon	14.2

図3. 大西洋サケ、ギンザケおよびベニザケの筋肉部位からラマン分光法を用いて測定したアスタキサンチン含有量。

2) タウリンの検出および定量

1)と同様の方法で、イカ類の可食部である外套膜、鰭および足と、精製タウリン標品からラマンスペクトルを取得し、比較することでその中からタウリンに帰属するラマンバンド (1045 cm^{-1}) を特定した。このバンド強度を、タンパク質と脂質に帰属するラマンバンド (1450 cm^{-1}) の強度比と比較して、タウリン濃度の測定を行った(図4)。本方法により測定されたスルメイカ中のタウリン含有量は、同一試料を HPLC で定量した結果と相関性があり、ほぼ同様の値となった。また、本方法を用いて他の魚介類のタウリン含有量を測定したところ、従来の測定値に類似した。これらの結果から、ラマン分光法は、タウリン含有量の測定にも有効であることが

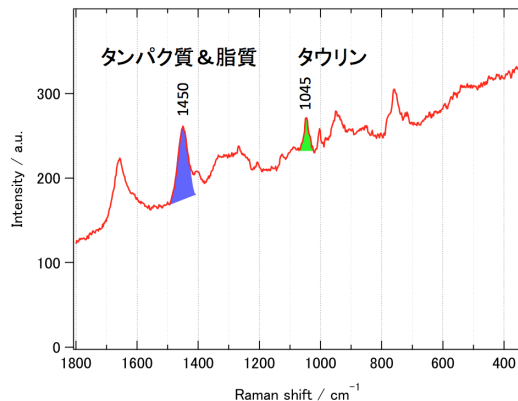


図4. イカの可食部から得られたラマンスペクトル。タウリン (1045 cm^{-1}) とタンパク質+脂質 (1450 cm^{-1}) の2つのバンドの強度比を用いて、タウリン濃度の比較を行った。

明らかとなった。

3) 多価不飽和脂肪酸の検出の試み

クロマグロの切り身から、ラマン分光法によって得られたラマンスペクトルの中から多価不飽和脂肪酸に特徴的なラマンバンドを少なくとも3つ選びだすことができた。さらに、多変量スペクトル分解によって、それらのバンドから少なくとも DHA、EPA およびアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸を不飽和度で区別して検出することが可能となった。本方法で便宜的に算出した不飽和脂肪酸含有量の値は、ガスクロマトグラフィーの結果と類似した結果となった。現在、さらに検体数を増やすことで、多価不飽和脂肪酸より正確に検出できるかを解析中である。

4) 総括

本研究課題において、ラマン分光法を用いることで、水産食品の機能性成分を簡便、迅速、且つ検体を破壊することなく測定できることが示された。今後、本技術がより広い食品分野で応用されることが期待できる。

< 引用文献 > -

Ando M, Hamaguchi H. (2013) Molecular

component distribution imaging of living cells by multivariate curve resolution analysis of space-resolved Raman spectra. Journal of Biomedical Optics, 19(1): 011016.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Jun-ichi Hikima, Masahiro Ando, Hiro-o Hamaguchi, Masahiro Sakai, Masashi Maita, Kazunaga Yazawa, Haruko Takeyama, Takashi Aoki. *On-site* Direct Detection of Astaxanthin from Salmon Fillet Using Raman Spectroscopy. Marine Biotechnology, 査読有, 2016 (In press)

[学会発表](計3件)

引間順一、安藤正浩、仲西友紀、河原 聡、酒井正博、瀧口宏夫、竹山春子、青木 宙。ラマン分光法によるマグロ筋肉に含まれる多価不飽和脂肪酸の検出の試み。平成28年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学(東京、品川)、平成28年3月26日~30日。

T. Aoki, M. Ando, H. Hamaguchi, J. Hikima, M. Sakai, T. Moritomo, T. Nakanishi, H. Takeyama. A new strategy to characterize different cell types from fish leukocytes using the bio-imaging technology of the confocal Raman microspectroscopy. 第7回水生動物健康国際シンポジウム (Seventh International Symposium on Aquatic Animal Health), ポートランド・オレゴン州(米国), 平成26年8月31日~9月4日。

引間順一、仲西友紀、河原 聡、酒井正博、川口恭一、保坂アツ子、安藤正浩、瀧口宏夫、宮岡智美、竹山春子、青木 宙。ラマン分光および高速液体クロマトグラフィーを用いたスルメイカに含まれるタウリンの定量。平成26年度日本水産学会秋季大会、九州大学(箱崎、福岡)、平成26年9月19日~22日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 宙 (AOKI, Takashi)
早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・
客員教授・招聘研究員
研究者番号: 00051805

(2) 研究分担者

引間 順一 (HIKIMA, Junichi)
宮崎大学・農学部応用生物科学科・准教授
研究者番号: 70708130