

顕微レーザーラマン分光法による ラット頭頂骨無機質成分の測定

Measurement on Mineral Components of Rat Calvaria
by Means of Lasers Raman Microprobe Spectrometry

田村典洋* , 筧 光夫* , 伊藤久昭** , 横山政昭***

* 明海大学 , ** 城西大学 , *** 株式会社堀場ジョバンイボン

生体アパタイトの形成過程において、その前駆物質として amorphous calcium phosphate (ACP), brushite, octacalcium phosphate (OCP) の存在が指摘されている。しかしながら、これらの前駆物質の生体試料内での存在確認はほとんどなされていない。生体アパタイト前駆物質の *in vivo* 試料での検出・確認を目的として、異なる成長段階のラットの頭頂骨を試料として顕微レーザーラマン分光法による検討を行った。ラット頭頂骨試料および合成標準試料ともに低温プラズマ灰化処理を行った hydroxyapatite (HA), β -calcium pyrophosphate (β -CPP), および β -tricalcium phosphate (β -TCP) ではプラズマ灰化処理による変化はみられなかった。一方、OCP および brushite の場合は灰化処理により変化が観察された。プラズマ灰化処理した胎児および新生児試料から得られたラマンスペクトルは、同様に灰化処理した OCP のラマンスペクトルとよく一致した。また、6日齢の試料では、HA に類似したスペクトルが得られ、12週齢の試料では、HA に特徴的なスペクトルが得られた。さらに 1000°C 熱処理した新生児試料のスペクトルは、HA に基づくピークおよび OCP を 1000°C で熱処理したときに得られる β -TCP に基づくピークを示した。本研究において、ラット頭頂骨の形成初期には HA の前駆物質として OCP の存在を示唆する結果が得られた。

It has been proposed that a precursor such as amorphous calcium phosphate (ACP), brushite, octacalcium phosphate (OCP) might exist in the early stage of the formation process of biological apatite for a considerable time. However, it hardly has been confirmed the existence of these precursors *in vivo*. The present study was designed to examine the presence of the precursor minerals of hydroxyapatite (HA) in rat calvaria by Raman microprobe spectrometry. Spectral measurements were performed on the rat calvaria and synthetic standards after plasma ashing and heat treatment at 1000°C. The results did not show that plasma ashing and heat treatment at 1000°C cause any changes in the synthetic HA, β -CPP and β -TCP. However, in the case of OCP and brushite, spectral changes were observed after plasma ashing. Spectral patterns of samples obtained from both embryonic and newborn rats were shown to be similar to those of OCP. On the other hand, both the 6-day-old and the 12-week-old rat samples gave the spectra similar to HA. Furthermore, the spectrum from newborn sample treated at 1000°C showed the peaks combined with both HA and β -TCP generated from OCP. In this study, it is assumed that OCP might exist as an intermediary during the process of HA development in the rat calvaria.

1

はじめに

生体におけるアパタイト結晶の形成は、いくつかの前駆物質を経て形成されると考えられている。しかしながら、多くの研究者により電子顕微鏡観察、X線回折法、赤外分光法及びラマン分光法などを用いて、前駆体鉱物の存在を証明する試みがなされたが、その存在についての十分な証拠は得られていない。これらの存在を直接検出、証明するには技術的困難さをともなうのが現状である。そこで、著者らは、前駆物質の熱に対する安定性の違いを利用して、間接的に *in vivo* 試料での検出を試みている。今回は、異なる成長段階にあるラット頭頂骨を試料として顕微ラマン分光法による検討を行った。

2

実験

装置としてはホリバグループのひとつであるジョバンイボン社製の顕微レーザーラマン分光装置 LabRam を用い、He-Ne レーザ(励起波長: 632.8nm, 出力 5mW)を光源として測定した。頭頂骨はラットより切り出した後、実体顕微鏡下、骨周辺の軟組織等を取り除き、蒸留水で洗浄後、室温で乾燥した。次いで、有機物を除去する目的で低温プラズマ灰化装置(270W, 90cm³/min of O₂, 8時間)にて処理したもの、およびこれらをさらに 1000°C に加熱処理したものを試料とした。HA (hydroxyapatite)³⁾, OCP(octacalcium phosphate)⁴⁾, β-CPP (β-calcium pyrophosphate)⁵⁾, β-TCP(β-tricalcium phosphate)⁴⁾などの合成標準試料については、同様に灰化処理および 1000°C 加熱処理を行ったものと未処理のものの両方を測定し比較検討に用いた。

3

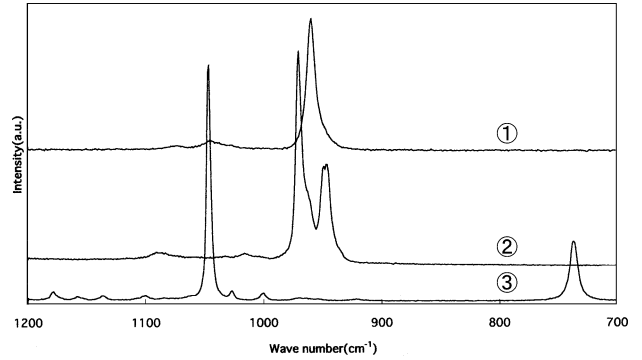
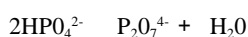
結果および考察

3.1 合成標準試料の灰化処理

合成 HA, β-CPP および β-TCP は灰化処理によってまったく変化が見られず、それぞれに特徴的なラマンスペクトルを与えた(図1)。

一方、OCP の場合は、灰化処理前は 968cm⁻¹(vs)と 960cm⁻¹(s)に doublet のピーク⁵⁾, 1010cm⁻¹(w)および 1050cm⁻¹(w)にピークを示したが、処理によって 965cm⁻¹(vs)に一本のピークと 1010cm⁻¹(sh)および 1035cm⁻¹(w)にピークを与えることがわかった(図2、)。

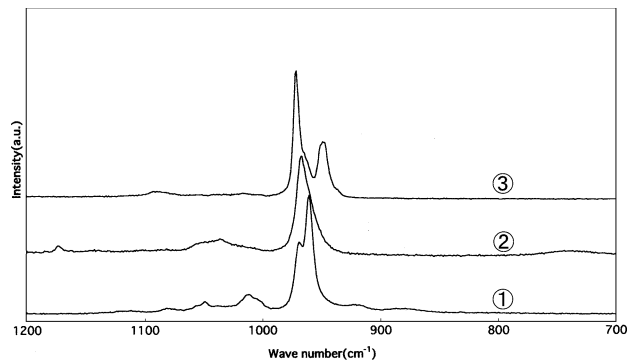
また、brushite⁶⁾ の場合には、987cm⁻¹(vs)と 875cm⁻¹(w)にあったピークが灰化処理によって消失し、1047cm⁻¹(vs)と 736cm⁻¹(m)にピークが観察された(図3)。このスペクトルは、β-CPP のスペクトルと一致することから、灰化処理により次の様な反応が起こったと考えられた。



HA, -TCPおよび -CPPはプラズマ灰化処理前と処理後でもまったく変化がなかった。
さらに1000°C加熱処理によっても変化が観察されなかった。

HA, -TCPおよび -CPPはプラズマ灰化処理前と処理後でもまったく変化がなかった。
さらに1000°C加熱処理によっても変化が観察されなかった。

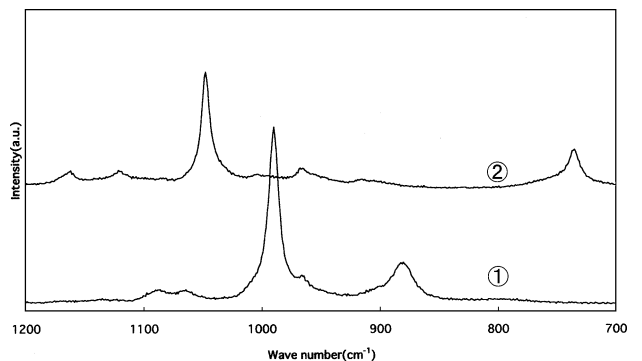
図1 合成標準試料(灰化処理前)のラマンスペクトル



未処理 プラズマ灰化処理後 1000°C加熱処理後

プラズマ灰化処理により960 cm⁻¹(s)と968 cm⁻¹(vs)の doublet のピークが、965cm⁻¹に1本の強いスペクトルに変化した。さらに1000°C加熱処理では946cm⁻¹(s), 948 cm⁻¹(s)と970 cm⁻¹(vs)にピークを示し、-TCPに一致したスペクトルが観察された。

図2 プラズマ灰化および 1000°C 加熱処理による OCP のラマンスペクトルの変化



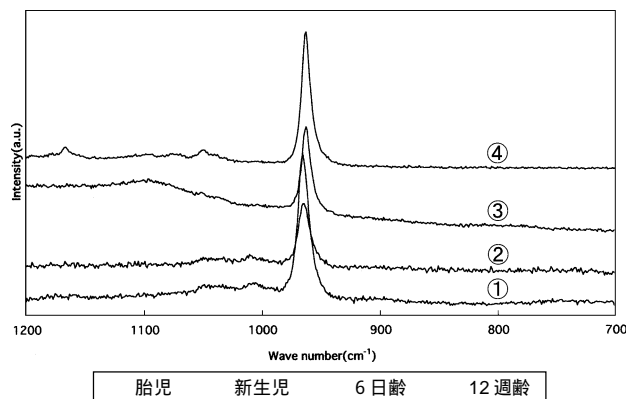
未処理 プラズマ灰化処理後

灰化処理により、875cm⁻¹(w)と987cm⁻¹(vs)のピークが消失し、736cm⁻¹(m)および 1047cm⁻¹(vs)にピークが観察された。さらに1000°C熱処理でも変化はなく、-CPPに一致したスペクトルが観察された。

図3 プラズマ灰化処理による brushite のラマンスペクトルの変化

3.2 頭頂骨試料の灰化処理

胎児(妊娠19日)および新生児試料では 965cm^{-1} (vs), 1010cm^{-1} (w)および 1035cm^{-1} (vw)にピークが観察された。ここで観察されたピークはOCPを灰化処理して得られたスペクトルによく一致することがわかった。また,6日齢の試料では 960cm^{-1} (vs)にピークが観察され,HAに類似したスペクトルが得られた。さらに,12週齢の試料では 960cm^{-1} (vs)および 1044cm^{-1} (w)にピークが観察され,HAに特徴的なスペクトルが得られた(図4)。



胎児(妊娠19日)および新生児試料では 965cm^{-1} (vs), 1010cm^{-1} (w)および 1035cm^{-1} (vw)にピークが観察された。これらのスペクトルはOCPを灰化処理して得られたスペクトルと一致した。また,6日齢の試料では 960cm^{-1} (vs)にピークが観察され,HAに類似したスペクトルを示した。さらに,12週齢の試料では 960cm^{-1} (vs)および 1044cm^{-1} (w)にピークが観察され,HAに特徴的なスペクトルを示した。

図4 プラズマ灰化処理によるラット頭頂骨試料のラマンスペクトル

3.3 合成標準試料の1000°C加熱処理

合成HA, β -CPPおよび β -TCPは1000°C加熱処理によってまったく変化が見られず,それぞれに灰化処理後と同様の特徴的なラマンスペクトルを与えた(図1)。

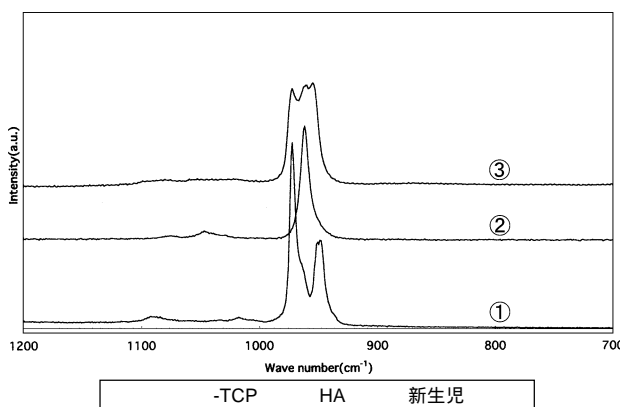
一方,OCPの場合は,1000°C加熱処理によって 946cm^{-1} (s), 948cm^{-1} (s), 970cm^{-1} (vs)にピークを示し,処理前後で全く異なるスペクトルが観察された(図2)。これは β -TCPのスペクトルと一致することから β -TCPが生成されたと考えられた。

また,brushiteの場合には,灰化処理後観察されたスペクトルは1000°C加熱処理によっても変化が見られず,合成標準試料の β -CPPのスペクトルと一致していた(図1-および図3-)。

3.4 頭頂骨試料の1000°C熱処理

胎児,新生児の頭頂骨試料では,1000°C熱処理により, 971cm^{-1} (vs), 959cm^{-1} (vs)および 953cm^{-1} (vs)にピークをもつスペクトルが観察された。新生児試料において得られたスペクトルを図5に示した。これらのピークは,HAおよび β -TCPに基づくものと考えられた。

これらの結果から新生児ラット頭頂骨試料中にOCPが存在していることが推察された。



新生児の頭骨試料では,1000°C熱処理により, 971cm^{-1} (vs), 959cm^{-1} (vs)および 953cm^{-1} (vs)にピークをもつスペクトルが観察された。これらのピークはHAおよび β -TCPに基づくものとして考えられた。

図5 1000°C熱処理による新生児ラット頭頂骨試料のラマンスペクトル

4

まとめ

プラズマ灰化処理して得られた胎児(妊娠19日)および新生児試料のラマンスペクトルは同様に灰化処理したOCPのラマンスペクトルと一致した。また,6日齢および12週齢の試料ではHAに特徴的なスペクトルが観察された。1000°C加熱処理した新生児試料からはHAおよび β -TCPに基づくラマンスペクトルが得られた。以上のことから,ラット頭頂骨の形成初期段階においてOCPがHAの前駆物質として存在することが強く示唆される結果が得られた。

なお,本研究によって得られた結果は,生体試料中の無機質成分の検索に,顕微ラマン分光法が極めて有用であることをしている。

なお,本稿の結果の一部は第4回分析化学東京シンポジウム・2000 機器分析東京討論会(東京)にて発表済みであり後に原著として投稿の予定である。

脚注

- 1) HA(hydroxyapatite): $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
- 2) OCP(octacalcium phosphate): $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 3) β -CPP(β -calcium pyrophosphate): $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
- 4) β -TCP(β -tricalcium phosphate): $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- 5) ピーク強度 vs : very strong, s : strong, m : medium, w : weak, vw : very weak
- 6) Brushite : $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$



田村典洋

Norihiro TAMURA, M.D.

明海大学
歯学部
歯学博士



笈 光夫

Mitsuo KAKEI, PhD

明海大学
歯学部
理学博士



伊藤久昭

Hisaaki ITO, M.D.

城西大学
薬学部
医学博士



横山政昭

Masaaki YOKOYAMA

株式会社堀場ジョバンイボン
アプリケーション・エンジニア