

## 原著

# 硬組織の質的評価に Micro FT-Raman を使用した基礎的研究

沼田靖子<sup>1)</sup>、寒河江登志朗<sup>2)</sup>、中田浩史<sup>3)</sup>、諏訪武利<sup>3)</sup>、小林喜平<sup>4)</sup>、佐藤勇<sup>5)</sup>

- <sup>1)</sup> 日本大学大学院松戸歯学研究科総義歯学専攻 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 〒 271-8587  
<sup>2)</sup> 日本大学松戸歯学部 組織・発生・解剖学講座 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 〒 271-8587  
<sup>3)</sup> 日本大学理工学部量子科学研究所・松戸歯学部 顎口腔義歯リハビリテーション学講座 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 〒 271-8587  
<sup>4)</sup> 日本大学総合科学研究所 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 〒 271-8587  
<sup>5)</sup> 日本大学大学院総合研究科 東京都千代田区九段南 4-8-24 〒 102-8275  
(受理: 2007年10月6日)

本研究の目的は、合成リン酸カルシウム、hydroxyapatite およびインプラントを埋入したラビットの骨組織を Raman 分光器にて分析し、Raman 分光器による硬組織中の微量成分の検出の可能性を探索することである。合成リン酸カルシウム (monobasic calcium phosphate, dibasic calcium phosphate, tribasic calcium phosphate)、hydroxyapatite およびインプラントを埋入したラビットの骨を本研究の分析試料とした。3種類の合成リン酸カルシウムおよびhydroxyapatiteの測定において、従来硬組織の研究に使用されてきたX線回折では特定できなかった各々の物質に固有のRamanbandsを得ることが出来た。さらに、インプラントを埋入して6週後のウサギ脛骨において、インプラント周囲の新生骨と、既存骨の  $\text{PO}_4^{3-}$  に  $3\text{cm}^{-1}$  の差異が認められた。Raman 分光器は  $1\text{cm}^{-1}$  の精密な分解能を有するため、ここで得られた差異は、既存骨と新生骨との骨質の差異を意味している。よって Raman 分光器は硬組織研究領域の一端を担う手法として重要な役割を持つと考えられる。

## Comparative Evaluation of Calcium Phosphates, Hydroxyapatite and Bone using Raman Spectroscopy

Yasuko Numata<sup>1)</sup>, Toshiro Sakae<sup>2)</sup>, Hiroshi Nakada<sup>3)</sup>, Taketoshi Suwa<sup>3)</sup>, Kihei Kobayashi<sup>4)</sup> and Isamu Sato<sup>5)</sup>

- <sup>1)</sup> Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo, Complete Denture Prosthodontics, 2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan  
<sup>2)</sup> Department of Histology, Cytology, and Developmental Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan  
<sup>3)</sup> Laboratory for Electron Beam Research and Application, Nihon University, Department of Gnatho-Oral Prosthetic Rehabilitation, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan  
<sup>4)</sup> Nihon University Research Center, 2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan  
<sup>5)</sup> Nihon University Advanced research Institute for the Sciences and Humanities, 4-8-24 Kudan-minami Chiyoda-ku, Tokyo 102-8275, Japan

Abstract: The purpose of this study was to evaluate synthetic calcium phosphates and animal bones using Raman spectroscopy, and explore the possibility of its application in characterizing newly formed bone around implants. Synthetic calcium phosphates (monobasic calcium phosphate, dibasic calcium phosphate and tribasic calcium phosphate), hydroxyapatite and rabbit bones with and without implants were analyzed in this study. Slight differences in the Raman bands among the 3 types of synthetic calcium phosphate and hydroxyapatite were observed. Furthermore, a  $3\text{cm}^{-1}$  difference was noted in the bands of the main  $\text{PO}_4^{3-}$  in rabbit's bone formed around the implant compared to the existing bone, suggesting a difference in the molecular structure between the existing and newly formed bone.

Keywords: Raman spectroscopy, bone, calcium phosphate, implant

### 緒言

生体内の硬組織においては、dicalcium phosphate dehydrate (DCPD):  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , octacalcium phosphate (OCP):

$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$ , carbonate apatite (CHA):  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{CO}_3)(\text{OH})$ を含む、さまざまな異なるタイプのリン酸カルシウムが存在する<sup>1)</sup>。官能基[e.g., phosphate (P-O), carbonate (C-O), hydroxyl

(O-H)] の存在を基礎とするリン酸カルシウムまたは骨の組成は、FT-IRのような赤外線分光器を使うことによって明らかにすることが出来る<sup>1,2)</sup>。一方 Raman 分光器 (RS) は赤外線ではなくレーザー光による Raman sift を検出しており、生物学的無機質 (石灰化された組織の無機の段階) を評価するのに用いられてきた<sup>3)</sup>。Raman 分光器は、集束されたレーザー光を使用することにより 1 $\mu$ m の空間分解能を検出することができ、また現在における分子レベルの分析装置の中で最も精度の高い機器であるといわれている<sup>3)</sup>。近年、顎顔面領域へのインプラントの普及に伴い、インプラント周囲に形成される新生骨に関する研究が活発である<sup>4-6)</sup>。しかしその研究の多くは新生骨の形態計測に主眼を置くものであり、実際にどのような骨が新生されているのか、インプラントに負荷されるであろう過重に耐え得る骨なのか、あるいは既存骨との差異はみられるのか等、新生骨の質そのものについて詳細に評価を行ったという報告はごくわずかである<sup>7)</sup>。本研究の目的は、合成リン酸カルシウム、hydroxyapatite およびインプラントを埋入したラビットの骨組織を Raman 分光器にて分析し、Raman 分光器による硬組織中の微量成分の検出の可能性を探索することである。

### 試料および方法

#### 試料

今回の実験において Raman 分光器にて測定された試料は、インプラントを埋入したウサギの脛骨、合成リン酸カルシウム (monobasic calcium phosphate:  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ , dibasic calcium phosphate:  $\text{CaHPO}_4$ , tribasic calcium phosphate:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; Wako Pure Chemical Industries Ltd. Japan) および hydroxyapatite (1200、1 時間焼成: 岡山大学 永井教之教授) である。試料は粉末状にて使用した。

#### 動物実験

実験プロトコールは、日本大学松戸歯学部実験動物倫理委員会の承認を受けて実施された。(承認番号 第 04-0027 号) 実験動物は 18 週齢、約 3kg、12 羽の New Zealand White Rabbit (三協ラボサービス) を使用した。全身麻酔は、ペントバルビタールナトリウム溶液 (ネプター® 大日本製薬) を用いて実験動物に 25mg/kg の耳静脈内注射で投与した。膝関節から抹消側 20mm の脛骨に、緻密骨の長軸に対し垂直に直径 2.8mm、深さが反対の緻密骨に達するように埋入窩の形成を行った。左右両側に直径 2.8mm、長さ 10.0mm の Ti-15% Zr-4% Nb-4% Ta 合金製インプラントを一本ずつ埋入し、埋入後にインプラント体の動揺がないことを確認した。観察期間は 3 週、6 週、12 週とし、ペントバルビタールナトリウム溶液の耳静脈内過剰投与にて安楽死させた。今回は埋入 6 週後の脛骨を試料とした。その後、摘出された脛骨はホルマリンによる固定を行った後、アルコール系列による脱水および樹脂包埋を行い、非脱灰標本とした。

偏光顕微鏡による観察

本実験では試料中の骨の存在を確認するために偏光顕微鏡を使用した。偏光顕微鏡による観察は、平行ニコル法、クロスニコル法および検板法にて行った。

#### Raman 分光器

Raman 分光器は、試料の分子構造についての情報を特徴づけるのに用いられる。試料の粉末は、スライドガラスの上に置かれ、それらのデータは Kaiser 社の Raman RXN1 マイクロスコープシステム (S.T. JAPAN Inc., Japan) を用いて収集した。測定はそれぞれ試料に最適なデータを得るための励起波長として、ウサギの骨組織は 532 nm および 785 nm、合成リン酸カルシウムおよび hydroxyapatite は 532 nm にて行われた。使用された機械の分解能は約 1  $\text{cm}^{-1}$  であった。測定に際し、あらかじめ機械を標準試料であるシリコンにて調整した。それぞれの試料について 100 ~ 3700  $\text{cm}^{-1}$  のスペクトルにおける情報を収集した。収集されたデータは、分析ソフト GRAMS (Thermo Galactic®, France) にて分析した。

#### 実験成績

##### 偏光顕微鏡による観察

偏光顕微鏡による観察結果を Fig. 1 に示す。既存骨ではコラーゲン線維による青色から黄色の強い偏光特性を示した。インプラント周囲にも、散在性に強い偏光特性を示す部分が観察され、新生骨の存在を確認することができた。Fig. 1

##### Raman 分光器による測定

合成リン酸カルシウム (monobasic calcium phosphate:  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ , dibasic calcium phosphate:  $\text{CaHPO}_4$ , tribasic calcium phosphate:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  および hydroxyapatite) のスペクトルを Fig. 2 に示す。

dibasic calcium phosphate と tribasic calcium phosphate で 963  $\text{cm}^{-1}$  にシャープな  $\text{PO}_4^{3-}$  の Raman bands を、monobasic calcium phosphate と tribasic calcium phosphate で 1047  $\text{cm}^{-1}$  にわずかな  $\text{PO}_4^{3-}$  の Raman bands を確認することができた。インプラントを埋入して 6 週後のウサギ脛骨における既存骨のスペクトルを Fig. 3、既存骨と新生骨の  $\text{PO}_4^{3-}$  を示すバンドを Fig. 4 に示す。また、これらのバンドのピークを Table 1 にまとめた。3 種類のリン酸カルシウム、hydroxyapatite、骨組織それぞれに固有の特徴ある Raman bands が得られ、Raman 分光器にて各々の差異の検出が可能であった。Fig. 2 ~ 4、Table 1

#### 考察および結論

リン酸カルシウムは組織変動、組織置換が容易に起こるため、Raman bands の高さだけで、その分子量を特定することは困難である。今回用いた合成リン酸カルシウムは、 $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{PO}_4^{3-}$  を含む分子量が異なるために、各リン酸カルシウムで異なる Raman bands が確認できた。また、そのパターンはそれぞれのリン酸カルシウムに固有のものであること

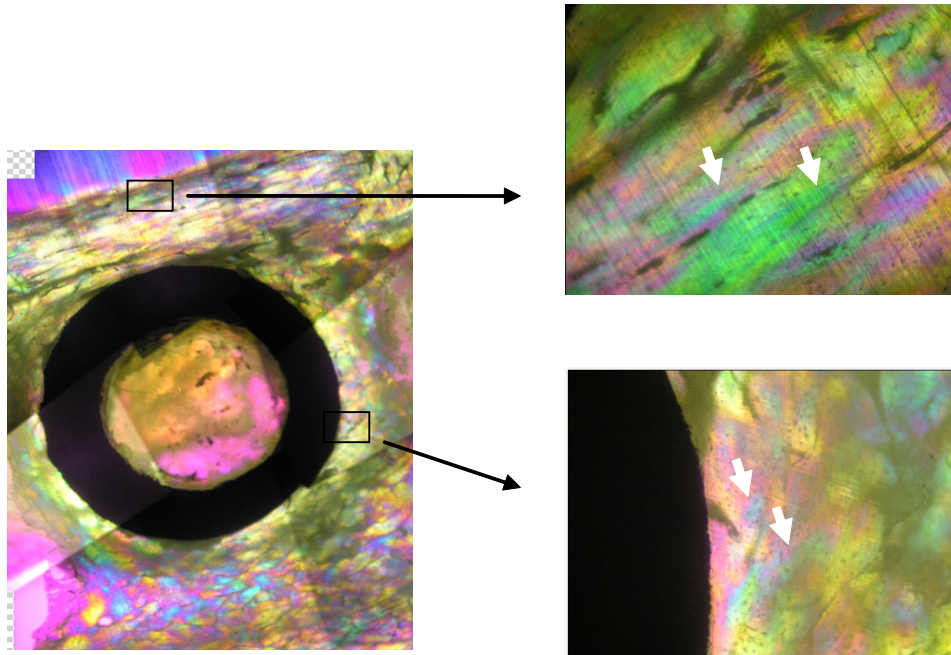


Fig.1 ウサギ脛骨（インプラント埋入6週後）の偏光顕微鏡像  
 a：既存骨の拡大像 b：新生骨の拡大像  
 矢印は強い偏光特性を示す部分

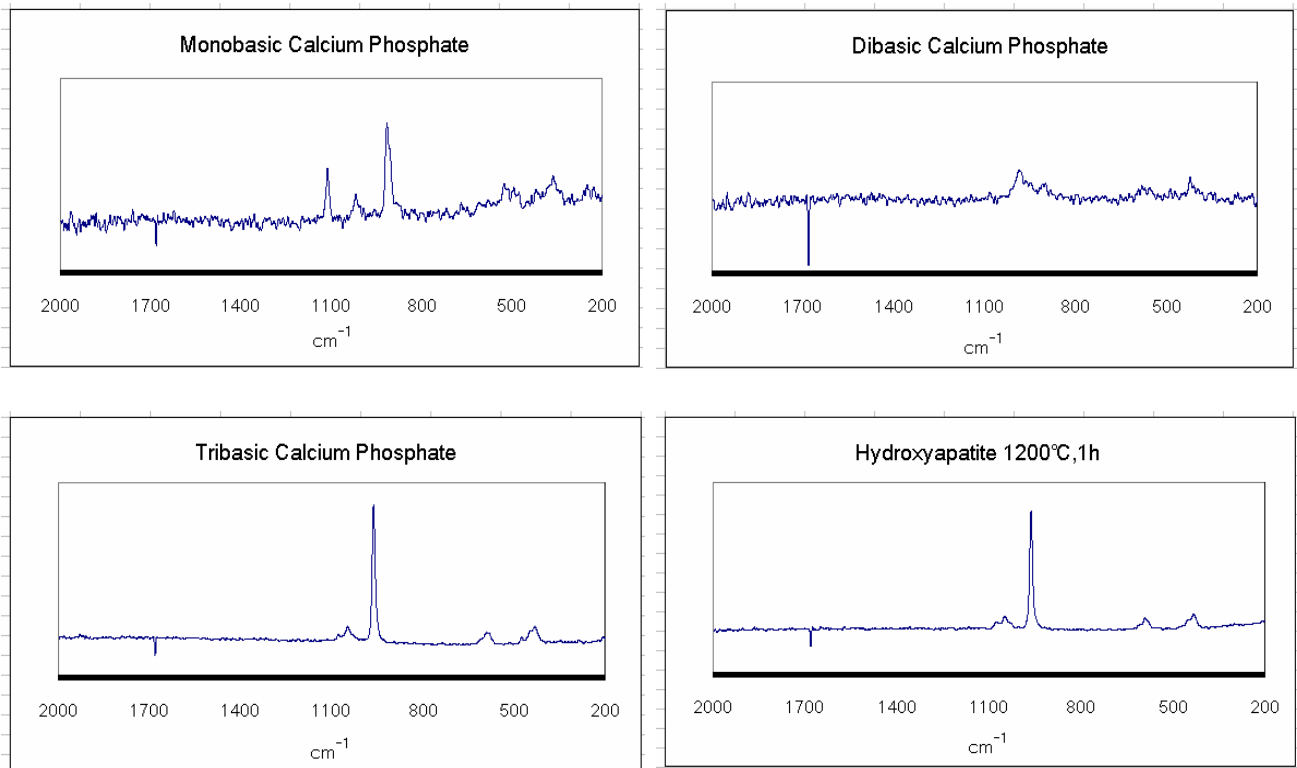


Fig.2 3種類のリン酸カルシウムおよびhydroxyapatiteの200-2000cm<sup>-1</sup>におけるRaman スペクトル

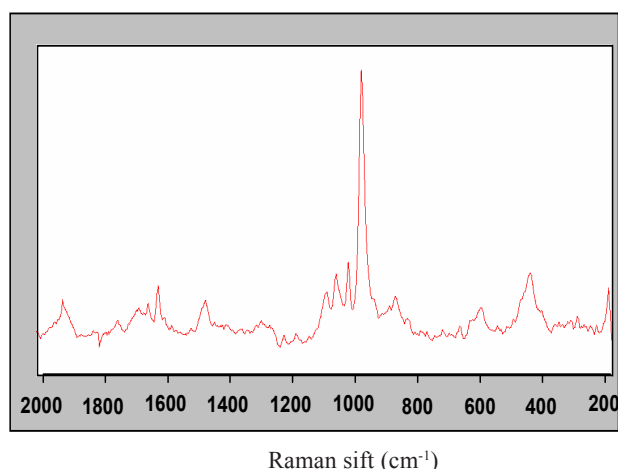


Fig.3・インプラントを埋入して6週後のラビット脛骨(既存骨)の Raman スペクトル

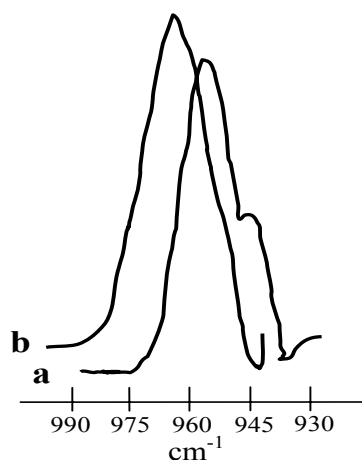


Fig.4 インプラントを埋入して6週後のラビット脛骨の  ${}_{1}\text{PO}_4^{3-}$  Raman bands  
a : 既存骨 959  $\text{cm}^{-1}$     b : 新生骨 962 $\text{cm}^{-1}$

から、生体中における微量成分の検出に Raman を使用することの有用性が明らかとなった。

次にインプラントを埋入して6週目の骨試料の測定を Raman にて行ったが、今回測定に使用した骨試料は樹脂によって包埋されていたため、通常の光学顕微鏡で観察した場合、試料に浸潤した樹脂と骨組織との区別は非常に不明瞭であった。骨の非脱灰標本は、有機成分および無機成分のいずれをも含有しているため、偏光顕微鏡において複屈折による特徴的な偏光像、および干渉像を呈示する<sup>8)</sup>。よって本実験で試料中の骨の存在を確認するために偏光顕微鏡を使用したところ、既存骨と同様インプラント周囲にも、散在性に強い偏光特性を示す部分が観察され、新生骨の存在を確認することができたため、同部位を新生骨の測定部位とした。

実際の測定においては、レーザーパワーおよび積算数等のパラメータを最適化することにより、ベースラインの安定化、それぞれの官能基におけるピークの明確化を行うことができた。励起波長 532nm の測定においては骨に含まれる有機構成成分(主にコラーゲン)による蛍光のために、明確な Raman bands を観察することはできなかった。しかしレーザーの励起波長を 785nm に変化させると、骨試料のスペクトルにおける bands は明確になることが明らかとなった。

インプラント周囲に形成された新生骨と既存骨では、 ${}_{1}\text{PO}_4^{3-}$  の Raman bands において  $3\text{ cm}^{-1}$  の差異が認められ、既存骨と新生骨との分子構造に差があることを確認することができた。これは、成熟した既存骨と比ベインプラント周囲における新生骨の石灰化度が未熟であるためと考えられる。

従来硬組織研究に使用されてきた FT-IR または X 線回折では、hydroxyapatite や他のリン酸カルシウムの差異を検出することは出来なかった。また硬組織の分析において、X 線回折におけるパターンはブロードであったが、本研究に使用した Raman 分光装置は  $1\text{ cm}^{-1}$  の精密な分解能を有するため、骨試料の測定においてシャープなピークを得ることができ、リン酸カルシウムと hydroxyapatite また hydroxyapatite と骨との間の差異を検出することが可能であった。さらに、非破壊的であり再現性に優れ、また集束されたレーザー光を使用することで  $1\mu\text{m}$  でのポイント分析が可能であることから、Raman 分光装置は生体硬組織における微量な組成の研究に適した装置であると考えられた。

### 謝辞

本研究費の一部は、平成 12 年度および平成 18 年度日本大学量子科学研究所電子線利用施設研究所学術フロンティア推進事業、独立行政法人日本学術振興会科学研究費補助金

Table 1 3種類のリン酸カルシウムおよび hydroxyapatite における Raman bands の位置比較

monobasic calcium phosphate	dibasic calcium phosphate	tribasic calcium phosphate	hydroxyapatite	existing bone
433	423	430	431	425
528	582	589	590	582
670	963	963	959	959
914	987	1047	1047	1039
1047	1086	1082	1085	1457

基盤研究 C 課題番号 18592145 および若手研究 ( B ) 課題番号 19791462 によって行われた。

**参考文献**

1. LeGeros RZ: Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Karger Basel; 1991. p. 24-36
2. Nicole JC, Victoria P, Michael DM, Pieter S and Michael AIJ: Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *BONE* 434-442 :39, 2006
3. Walters MA, Leung YC, Blumenthal NC, LeGeros RZ and Konsker KA: A Raman and infrared spectroscopic investigation of biological hydroxyapatite. *J Inorg Biochem* 193-200: 39, 1990
4. Lezzi G, Scarano A, Petrone G and Piattelli A: Two human hydroxyapatite-coated dental implants retrieved after a 14-year loading period: a histologic and histomorphometric case report. *J Periodontol* 940-947: 78, 2007
5. Katranji A, Misch K and Wang HL: Cortical bone thickness in dentate and edentulous human cadavers. *J Periodontol* 874-878: 78, 2007
6. Nakada H, Sakae T, LeGeros RZ, LeGeros JP, Suwa T, Numata Y and Kobayashi K: Early Tissue Response to Modified Implant Surfaces Using Back Scattered Imaging. (2007) *Implant Dentistry* 281-289: 16(3), 2007
7. 諏訪武利、寒河江登志朗、中田浩史、加藤仁夫、小林喜平: アパタイトプラスト処理インプラント周囲における新生骨の結晶性の評価 . *日口腔インプラント誌* . 19: 453-460, 2006
8. Schmidt WJ: Polarizing Microscopy of Dental Tissue; 1971. p. 12-16