

赤外ラマン顕微鏡 AIRsightによる ラット大腿骨断面の非染色分析と骨質評価

丹下 祥之

ユーザーベネフィット

- ◆ 骨を染色することなくハイドロキシアパタイトやコラーゲンの分布を確認することができます。
- ◆ 赤外・ラマン分光法から、分析対象の成分を感度よく検出できる最適な分析手法を選択できます。
- ◆ 赤外・ラマンスペクトルを詳細に解析することで、骨質にかかわる成分比率や成分の成熟度を評価できます。

■はじめに

骨粗鬆症の予防には、単位体積当たりの骨の量を示す骨密度に加えて、骨の質（骨質）が重要とされています。骨は主にハイドロキシアパタイト（無機物）とコラーゲン（有機物）で構成されています。骨質に関しては、無機／有機成分の比率や、ハイドロキシアパタイトの結晶性などが評価されています。赤外顕微分光法とラマン顕微分光法はともに染色することなく、骨の化学的な成分分布を確認できる上、詳細なスペクトル解析により、骨質に関わる情報も取得できます。両分光法は、ともに振動分光法に基づく手法ですが、一方の手法でしか得られない情報もあるため、赤外顕微分光法とラマン顕微分光法は相補的な関係にあると言えます。

今回は、赤外ラマン顕微鏡AIRsightを用いて、ラット大腿骨断面の非染色分析を行いました。AIRsightを用いると、赤外顕微分光法とラマン顕微分光法を1つの装置で実現できるため、様々な成分が分析対象となります。さらに、より最適な解析方法を選択することで、骨質情報を取得することも可能です。

■ラット大腿骨の赤外・ラマン顕微測定

ラット大腿骨断面に対し、赤外顕微反射測定とラマン顕微測定を行いました。摘出後の大腿骨に対して、ライカマイクロシステムズ製ミクロトームHistoCore AUTOCUT Rを用いて、長軸に直行する方向に凍結切削しました。切削後、図1のようにミクロトーム用治具に取り付けた状態で試料台に設置することで、測定面の平行を保ったまま測定できます。なお、骨の無機成分と有機成分の両方を分析するために、ハイドロキシアパタイトを取り除き加工を容易にする処理（脱灰）は行いませんでした。



図1 ラット大腿骨の断面観察の様子

断面の観察画像を図2に示します。測定面とステージが平行であるため、広い視野であっても全体に焦点が合っていることがわかります。

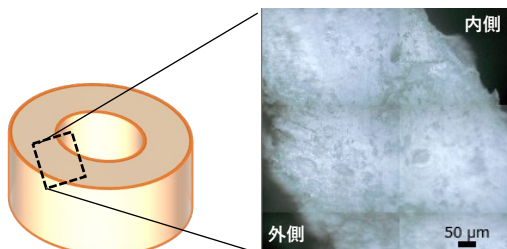


図2 ラット大腿骨断面の観察画像

赤外分光測定およびラマン分光測定のマッピング測定条件を表1に示します。

表1 測定条件

装置	: IRTracer™-100, AIRsight
赤外分光測定	
分解	: 8 cm ⁻¹
積算回数	: 200
アポダイズ関数	: SqrTriangle
アパーチャサイズ	: 50 μm×50 μm
ステップ幅	: 50 μm
マッピング範囲	: 650 μm×300 μm
検出器	: T2SL
ラマン分光測定	
積算回数	: 5
露光時間	: 10.0 sec
対物レンズ	: 50 倍
励起波長	: 785 nm
レーザー径	: 5 μm
ステップ幅	: 50 μm
マッピング範囲	: 650 μm×300 μm
検出器	: CCD

■赤外・ラマンスペクトルによる大腿骨の帰属

赤外分光法およびラマン分光法によるラット大腿骨のスペクトルと主な帰属を図3に示します。

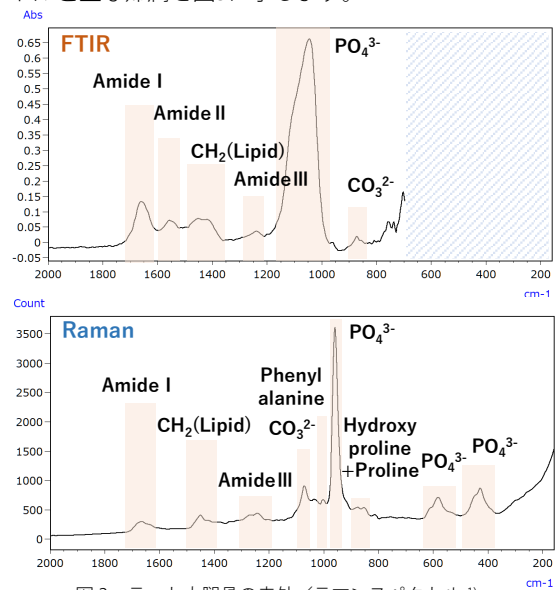


図3 ラット大腿骨の赤外／ラマンスペクトル¹⁾
(Phe:Phenylalanine, Hyp:Hydroxyproline, Pro:Proline)

今回は非脱灰試料のため、コラーゲン由来のピーク (Amide I/II/III) とハイドロキシアパタイト由来のピーク (PO_4^{3-}) も同時に確認されています。また、各々赤外・ラマンスペクトルでしか確認できないピークや、同じ帰属であっても強度が異なったり、ピーク形状が異なる様子も確認できました。

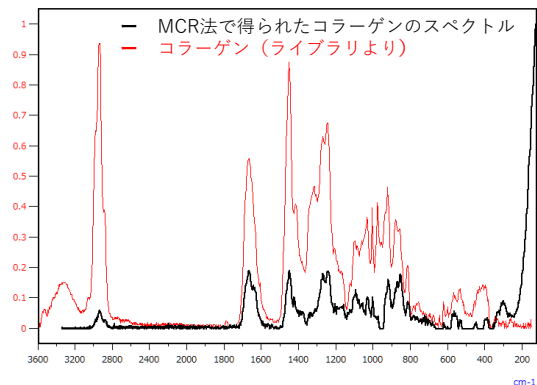
■多変量解析による成分の分離と分布観察

Multivariate curve resolution (MCR) 法は、多成分が含まれるスペクトルから、各成分のスペクトル (純スペクトル) と濃度情報を取得できる多変量解析手法です。複数の混合物スペクトルから独立に変動する純スペクトルを複数選択し、交互最小二乗法に基づいて、最適化計算をします。

・成分分布分析 コラーゲンとハイドロキシアパタイト

大腿骨のラマンマッピング測定を行い、取得したマッピングデータに対して、MCR法によりコラーゲンとハイドロキシアパタイトを分離し、相対濃度分布のケミカルイメージを作成しました。それぞれの成分スペクトルの定性結果を図4に、ケミカルイメージを図5に示します。青色は相対的に濃度が低く、赤色は濃度が高いことを示しています。

Copyright c 1980, 1981-2023 John Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved.c 1980, 1981-2023 John Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved.



Copyright c 1980, 1981-2023 John Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved.c 1980, 1981-2023 John Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved.

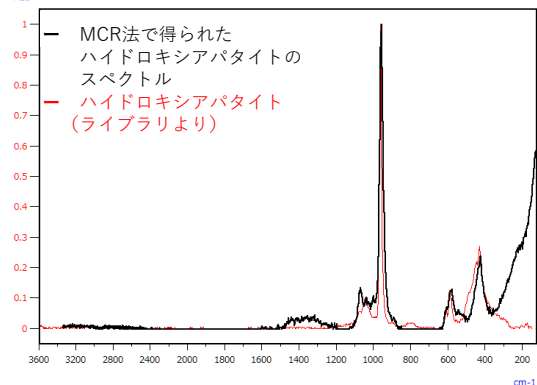


図4 MCR法で分離した成分スペクトルの検索結果

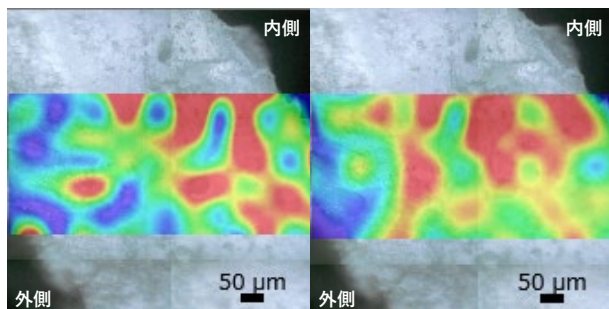


図5 MCR法によるケミカルイメージ (左: コラーゲン、右: ハイドロキシアパタイト)

図4より、MCR法によってコラーゲンおよびハイドロキシアパタイトがきれいに分離できていることがわかりました。また、図5に示したケミカルイメージより、ハイドロキシアパタイトは骨断面全体に分布しているのに対して、コラーゲンは骨の内側に比較的多く分布していることがわかりました。

■各成分由来ピークの分布確認と骨質評価

赤外/ラマン分光法ともに試料の表面状態により、スペクトル全体の強度に変動が見られる場合があります。今回は、各成分由来のピークの比率を用いて、相対的な成分分布を確認しました。いずれの成分分布についても青色は相対的に濃度が低く、逆に赤色は濃度が高いことを示しています。

・骨質評価① Mineral to matrix ratio

ハイドロキシアパタイトとコラーゲンの成分比率に由来する PO_4^{3-} と Amide I の比率は Mineral: matrix ratio と呼ばれ、骨形成の時間経過とともに増加すると報告されています²⁾。赤外スペクトルの PO_4^{3-} と Amide I のピーク面積比を図6に示します。ラマンスペクトルから同様のピーク面積比を得ることもできますが、両ピークが明瞭に確認できる赤外スペクトルのデータを採用しました。

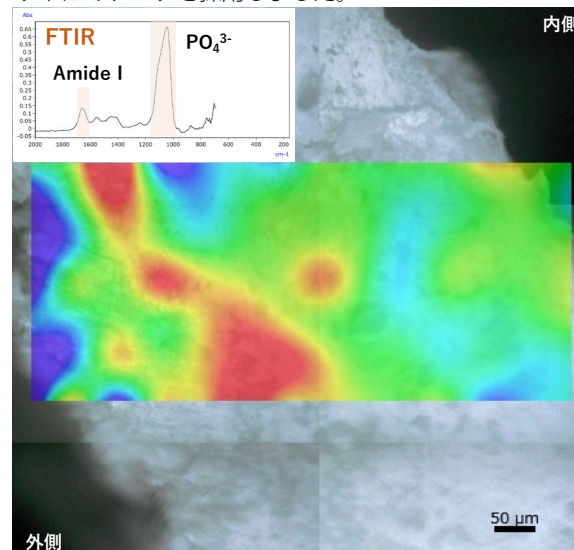


図6 赤外スペクトルのピーク面積比 ($\text{PO}_4^{3-}/\text{Amide I}$)

図6を見ると、骨外側付近で骨断面の輪郭に沿った方向に強く分布していることから、この部分で骨形成がより進行していることがわかります。

・骨質評価② Carbonate to phosphate ratio

ハイドロキシアパタイト中の CO_3^{2-} (炭酸塩, Carbonate) と PO_4^{3-} (リン酸塩, Phosphate) の比率は骨の溶解度を変化させ、骨の新陳代謝 (骨リモデリング) に影響すると報告されています³⁾。ラマンスペクトルによる CO_3^{2-} と PO_4^{3-} のピーク面積比を図7に示します。 CO_3^{2-} 由来のピークは赤外分光法、ラマン分光法ともに測定できますが、より明瞭に確認できるラマンスペクトルのデータを採用しました。

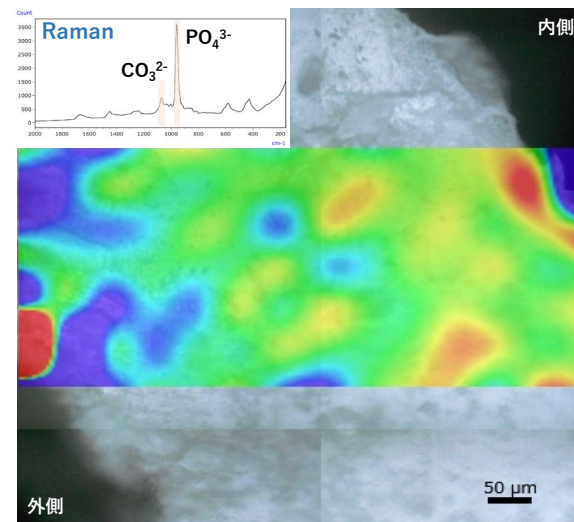


図7 ラマンスペクトルのピーク面積比 ($\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$)

今回の測定では縁辺部に分布しているため、この部分で骨の新陳代謝が活性化されている様子が確認できました。

・骨質評価③ Mineral maturity

ハイドロキシアパタイトの結晶性に関する指標として、Mineral maturityがあります。Mineral maturityの評価方法は複数ありますが、ここでは、大腿骨の赤外スペクトルにおける1,030 cm⁻¹と1,110 cm⁻¹のピーク比を使用する方法を用いました。赤外スペクトルのPO₄³⁻は結晶状態によってピーク波数が異なり、1,030 cm⁻¹は結晶構造に欠損のないハイドロキシアパタイト、1,110 cm⁻¹は結晶性の乏しいハイドロキシアパタイト由来のピークです。赤外スペクトルでは、それぞれのピークが重なり合った形状になっていますが、赤外スペクトルに対して2次微分処理を行うことで、定量性を保ったまま重なり合ったピークを分離することができます(図8)。

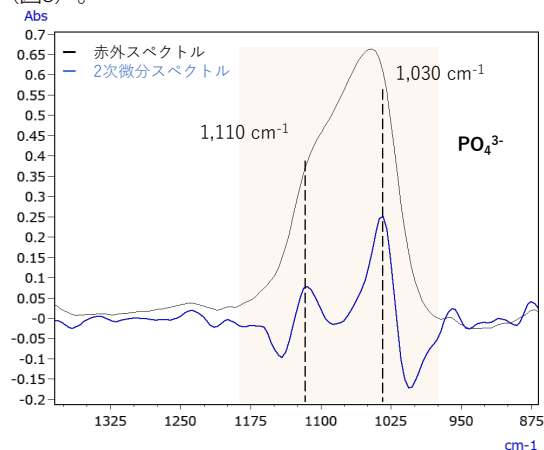


図8 ラット大腿骨の赤外スペクトルと2次微分スペクトル
(2次微分スペクトルは正負を反転)

図9には、赤外マッピングの各測定点における2次微分スペクトルのピーク高さ比を示します。Mineral maturityの高い部位は骨断面に点在していますが、骨の輪郭線よりも少し中央寄りに帯状に分布していることがわかります。

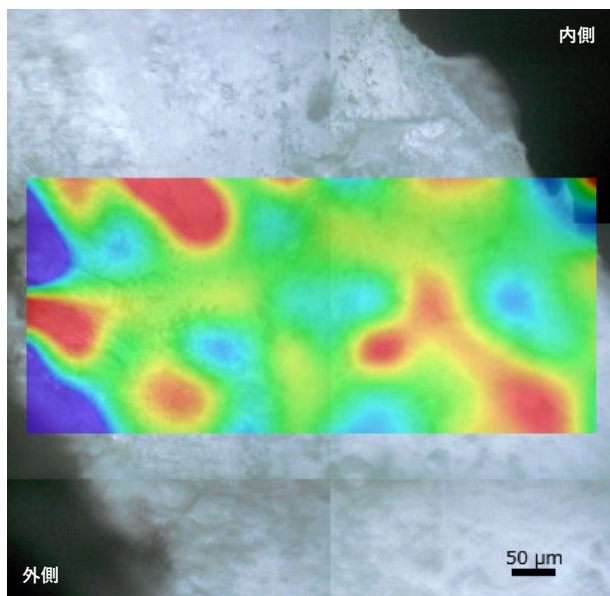


図9 赤外スペクトルの2次微分スペクトルのピーク比 (1,030 cm⁻¹/1,110 cm⁻¹)

・骨質評価④

Phenylalanineとハイドロキシアパタイトの成分比

赤外分光法ではピークが確認できない(赤外不活性)成分でも、ラマン分光法で測定できる場合があります。例えば、図3におけるアミノ酸の一種であるPhenylalanine、Hydroxyproline、Prolineが挙げられます。

ここでは、大腿骨のラマンマッピングデータを用いて、Phenylalanineとハイドロキシアパタイトの成分比を評価しました。ラマンスペクトルによるPhenylalanine/PO₄³⁻の相対比率のケミカルイメージを図10に示します。骨の外側に強く分布していることがわかりましたが、これは骨膜の影響と考えられます。

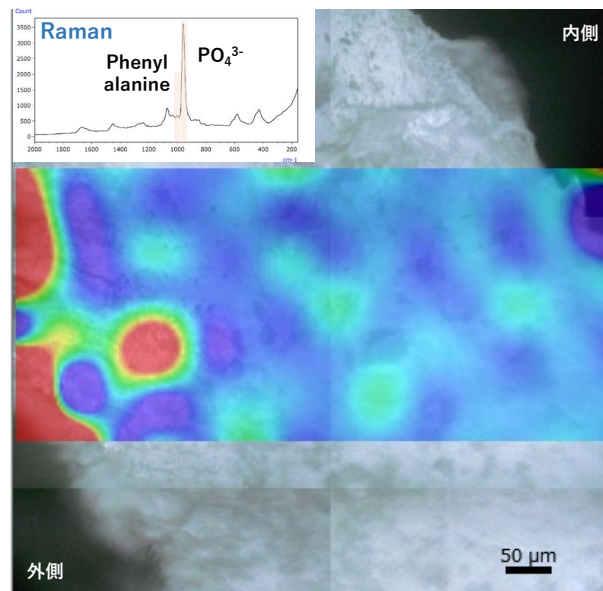


図10 ラマンスペクトルによるピーク面積比
(Phenylalanine/PO₄³⁻)

■まとめ

赤外顕微鏡AIRsightを用いてラット大腿骨断面の非染色分析と骨質に関わる指標の分布評価を行いました。AIRsightは、1台の顕微鏡で赤外分光法とラマン分光法、両手法による分析ができるため、試料をステージ上に置いたまま、一度により多くの成分を分析できます。また、多変量解析手法を活用することで、混合物スペクトルから成分スペクトルとその濃度分布のケミカルイメージを取得することもできます。さらに、重畳したピークを微分処理することで、結晶性の評価も可能となりました。なお、今回行ったいずれの分析処理についても赤外ラマン顕微鏡用ソフトウェアAMSolutionで行うことができます。

<謝辞>

本アプリケーションの作成にあたり、名古屋大学大学院工学研究科松本健郎先生、前田英次郎先生には、試料のご提供など多大なるご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

<参考文献>

- 1) Erik A. Taylor, Eve Donnelly, "Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties," Bone. 139 (2020).
- 2) E.A. Taylor, A.A. Lloyd, C. Salazar-Lara, E.L. Donnelly, "Raman and FT-IR mineral to matrix ratios correlate with physical chemical properties of model compounds and native bone tissue", Appl. Spectrosc. 0 (2017).
- 3) A. Grunewald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, C. Drouet, Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: a validated FTIR methodology, J. Archaeol. Sci. 49 (2014).

AIRsight, IRTTracer は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00632-JP 初版発行：2023年9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。
本文書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。