

ラマンイメージングによる石灰化過程の経時的観察

Time lapse observation of osteoblastic mineralization by Raman imaging

阪大院工¹, 阪大院歯², 阪大フォトリクスセンター³ ○橋本 彩¹, 邱 亮達¹, 沢田 啓吾²,
池内 智彦¹, 藤田 克昌¹, 竹立 匡秀², 山口 佳則^{1,3}, 河田 聡^{1,3}, 村上 伸也², 民谷 栄一^{1,3}
Osaka Univ.^{1,2,3}, ○Aya Hashimoto¹, Liang-da Chiu¹, Keigo Sawada², Tomohiko Ikeuchi¹,
Katsumasa Fujita¹, Masahide Takedachi², Yoshinori Yamaguchi^{1,3},
Satoshi Kawata^{1,3}, Shinya Murakami², Eiichi Tamiya^{1,3}

E-mail: hashimoto@ap.eng.osaka-u.ac.jp

骨形成は、骨芽細胞による石灰化過程から始まる。石灰化とは、骨の主成分である Hydroxyapatite (HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) を生成・沈着し、骨組織を形成する機構である。従来の生化学的アッセイには、侵襲性が高く同一組織の経時的解析ができない、培養 well 内の全細胞の平均の評価を行うものであるため任意の微小領域に着目することが困難である、といった問題がある。そのため従来法では、骨芽細胞周辺にどのような分子が経時的に発現・局在することにより硬組織を形成するのかを知るのには困難である。

ラマン分光法は、低侵襲で生体分子を検出できる技術である。ラマン散乱光の持つ情報は、試料に含まれる分子の種類や構造を反映しているため、試料中の分子やその状態を特定することが可能である。ラマン分光法には、前処理が不要であること、同時に複数分子の検出が可能であること、ラベルフリーであるため試料内の環境を大きく変化させないこと、低侵襲であることといった利点がある。さらに、顕微鏡と組み合わせてラマンイメージングを行うことにより、試料中におけるターゲット分子の分布の可視化が可能である。このような利点から、骨芽細胞による石灰化過程の経時的解析にラマン分光法が有用であると考えた。本研究において私達は、マウス骨芽細胞様株 KUSA-A1 が石灰化物を形成するよう分化誘導し、その分化過程をラマンイメージングにより解析した。この際、HA を分化マーカーとした。HA の生成は成熟した骨芽細胞により産生される基質小胞内において開始されるため、骨芽細胞への分化度を表す指標となる。分化誘導中の KUSA-A1 に対し、4 時間毎にラマン分光測定を行い(図), ラマンイメージングを構築した。その結果、石灰化を促進するとされるカロテノイド類がまず微小領域で検出され、カロテノイドの消失から 8 時間後以降、その微小領域で HA が生成され、HA に帰属するピークの強度が次第に増加していく様子が観察された。

Raman spectra from osteoblast tissue

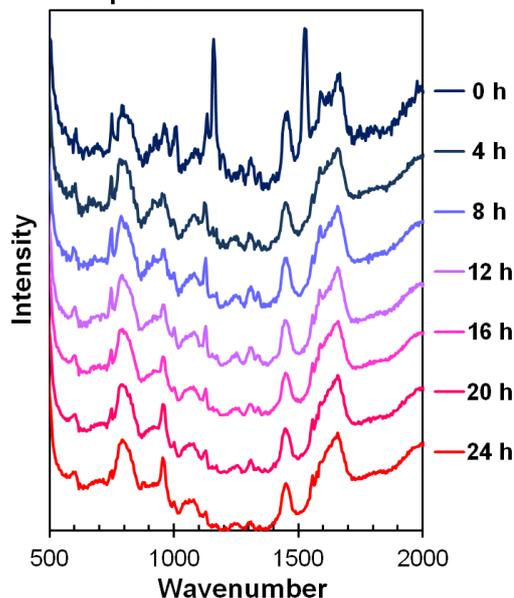


図. KUSA-A1 から得られたラマンスペクトル。
図では測定開始時間を 0h としている。