

# 学位論文の要約

題目 赤外イメージング・赤外二色性イメージングによる新規骨形態計測法の開発と慢性腎臓病の病態解析

千歳科学技術大学大学院光科学研究科

氏名 伊藤 哲平

## 【第一章 緒言】

骨組織は水、有機成分、無機成分で構成され、有機成分の約 90%が I 型コラーゲン、無機成分がリン酸カルシウムである。骨の健康指標である骨強度は、原発性骨粗鬆症や骨軟化症など骨疾患の他、糖尿病、高血圧、慢性腎臓病(CKD)に伴うミネラル代謝異常により低下することが知られている。骨強度の評価は骨密度を計測することが最も有用な手段であると考えられていたが、2000 年 NIH Consensus Conference において、「骨強度には骨密度が 70%と骨質(構造特性・材質特性)が 30%程度反映される」と定義されてからは、骨質に関する基礎研究が盛んに行われるようになり、従来は材料解析に用いられてきた機器分析を採用した骨質評価法が注目されるようになった。

我々はこれまで赤外イメージングやラマンイメージングを用いた骨質解析を行ってきた。しかしながら、得られた骨質データは必ずしも骨強度と強い相関関係にはなく、骨質の新規計測・解析法の開発が課題となった。本研究では、骨成分であるコラーゲン線維と骨アパタイト(主にヒドロキシアパタイト)の配向性に着目し、赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイトの配向性評価法の開発および従来法と配向性評価法を駆使した CKD モデルラットの病態解析を行った。また、試料調整によって生じる骨の変性を最小限に留め、試料調整時間短縮と低コスト化を目的とした凍結切片作製法の開発も行った。

## 【第二章 コラーゲン線維および骨アパタイトの配向性評価法の開発】

本章では骨を有機-無機ハイブリッド材料と位置づけし、有機成分であるコラーゲン線維が骨における機能性フィラーとしての役割を担い、その配向性が骨強度に影響を及ぼすと考えた。コラーゲン線維の配向性の評価方法として、配向性の分布、ならびに石灰化度、炭酸塩含有率、結晶化度、結晶成熟度など他の骨質因子についても同時に計測できる赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維配向性評価方法を提案し、骨アパタイトを構成している成分の配向性も調べながら、コラーゲン線維と骨アパタイトの配向性の関係について検討した。配向性評価法の開発では、生後 16 日と 6、12、33 週齢の雄性 SD ラットの大腿骨を用いた。安楽死後に摘出した大腿骨は、ポリメタクリル酸メチル(PMMA)による包埋を施し、3  $\mu\text{m}$  の薄切片にした。赤外二色性イメージングでは、赤外イメージング装置に偏光子を設置し、0°と 90°で各薄切片を測定した。コラーゲン線維と骨アパタイトの配向性は、

それぞれ amide I と  $PO_4^{3-}$  バンドによる赤外二色性イメージから得た。また、赤外イメージングを用いて同検体の石灰化度、炭酸塩含有率、結晶化度、結晶成熟度を求めた。

### 【第三章 臨床応用が可能な硬組織凍結切片作製法の開発】

本章では赤外イメージングを用いて骨切片の作製過程で行われる固定や脱水、包埋が骨質に及ぼす影響を明らかにし、新規凍結切片作製法を提案した。まず、エタノールや中性緩衝ホルマリン溶液による影響を調べ、いずれも骨の主成分であるコラーゲンの変性を引き起こすことを示した。新規凍結切片作製法では、4  $\mu\text{m}$  のポリプロピレン(PP)フィルムに接着剤を塗布し、凍結切片をフィルムに固定、フィルムの接着面を  $BaF_2$  基板と合わせ、赤外イメージング、赤外二色性イメージングによる測定(透過法)を行った。その際、4  $\mu\text{m}$  の PP フィルムがイメージングの結果に影響を及ぼさないことを確認した。また、マウスから摘出した左右大腿骨をそれぞれ凍結切片法と PMMA 包埋法によって薄切片にし、赤外イメージングによる骨質解析を行った。赤外イメージから抽出した赤外スペクトルを比較した結果、骨アパタイト由来の  $PO_4^{3-}$  バンドとコラーゲン由来の amide I バンドの幅や形状は凍結切片法と PMMA 包埋法の薄切片では異なることが示された。本章では、新規凍結切片作製法で作製した大腿骨切片のコラーゲン線維と骨アパタイト配向性も検討した。

### 【第四章 CKD に伴う高回転型および低回転型の骨質解析】

本章では、CKD に伴う高回転型(H-CKD)と低回転型(L-CKD)骨代謝異常の骨質の違いを明らかにするために、それぞれ5/6 腎摘出術、5/6 腎摘出術と甲状腺摘出を施した高回転型と低回転型骨代謝異常のCKD モデルラットを作製した。各ラットはリンとカルシウムの量を調整した飼料を与え、18 週間飼育、安楽死させた後に大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨は、赤外イメージング、赤外二色性イメージング用に薄切片にしてから骨質解析を行った。その結果、H-CKD の炭酸塩含有率と結晶成熟度はコントロール群に対して有意に低値を示した。また、H-CKD と L-CKD の大腿骨骨幹端部におけるコラーゲン線維と低結晶性アパタイトの配向性は、骨幹部に比べて著しく低下し、この傾向は H-CKD で顕著に現れた。

### 【第五章 結論】

赤外二色性イメージングによるコラーゲン線維と骨アパタイトの配向性評価は、新たな骨質評価法として極めて有効であることが示され、従来の骨質解析法と併用することにより、H-CKD と L-CKD の骨質の違いを明らかにすることができた。また、4  $\mu\text{m}$  の PP フィルムを用いた凍結切片作製法は試料調整の時間短縮と低コスト化を実現したことから、臨床応用が期待される。