

## 近・中赤外分光法による骨ならび軟骨評価法の開発

Development of bone and cartilage assessment techniques using near-infrared and mid-infrared spectroscopy

中村 郁哉 (Fumiya NAKAMURA)

Over the last 20 years, osteoporosis is defined as a skeletal disorder characterized by compromised bone strength predisposing to an increased risk of fracture, and bone strength reflects the integration of bone density and bone quality, which is material and structural properties of bone. Infrared spectroscopy has attracted attention due to its ability to visualize the material properties of bone. However, the method for evaluating bone quality by infrared spectroscopy has not been standardized and has not been applied clinically. In this study, we evaluated various bone and cartilage using infrared spectroscopy to standardize bone quality assessment for clinical application.

骨粗鬆症は骨強度の低下を特徴とし、骨折リスクが増大しやすくなる骨格疾患であり、骨強度は骨密度と骨質を反映する。: A skeletal disorder characterized by compromised bone strength predisposing to an increased risk of fracture, bone strength reflects the integration of bone density and bone quality<sup>1)</sup>と定義されてから20年、様々な機器分析を用いた骨質評価が行われてきた。中でも赤外分光法は材質特性を評価できることからいち早く注目され、近年ではイメージング技術の発展により骨質の可視化が可能となった。一方、赤外分光法による骨質評価法は未だ標準化が行われていないため臨床応用に至っていない。そのため本研究では様々な骨ならび軟骨の評価を行いながら、臨床応用を目的とした赤外分光法による骨質解析の標準化を行う。

### 1. 画像解析法を用いた赤外イメージングによる新規骨質定量分析技術の開発

赤外イメージングによる骨質の可視化は C. Marcott らによって初めて報告されてから<sup>2)</sup>、現在に至るまで、赤外イメージを構成するスペクトルのリン酸バンドやアミドIバンドを用いて石灰化度、炭酸塩含有率、結晶化度、ミネラル成熟度などの骨質因子の定量分析が行われている。高精度な定量分析を行うためには透過法を用いる必要があり、試料は赤外光が透過する3 $\mu\text{m}$ 以下の薄切標本にする必要がある。一般に、非脱灰の骨を薄切標本にするためにはMMAによる樹脂包埋を行う。その結果、薄切標本の赤外スペクトルにはPMMA由来のバンドも現れ、差スペクトルによるPMMA由来のバンド除去が必要となる(Fig.1)。例えば、ラット大腿骨の骨質解析では、数平方センチメートルに及ぶ赤外イメージから任意の赤外スペクトルを抽出し、PMMAの差スペクトルを行った後、リン酸バンドやアミドIバンドの面積や高さを用いて骨質因子の数値化を行う。この評価方法では、①使用するスペクトル数や抽出する部位により値にバラツキが生じる、②解析に時間を要すなど幾つかの問題点がある。そこで本研究では、より迅速かつ高精度

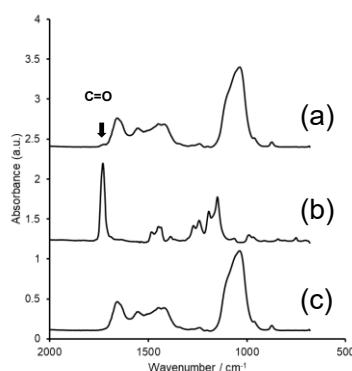


Fig.1 Typical FTIR spectra. (a) raw, (b) PMMA and (c) subtracted PMMA from raw spectra.

な骨質の定量分析を目的とした画像解析法の開発を行い従来法と比較した。[方法] 21週齢雌性ラット(n=10)は安楽死後に大腿骨を抽出し、非脱灰薄切標本を作製した。その後、赤外イメージング

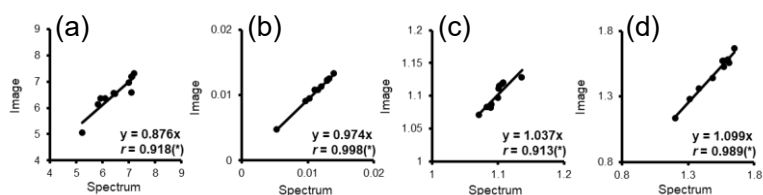


Fig.2 Correlation analysis of bone quality (image vs. spectra).  
 (a) mineral-to-matrix ratio, (b) carbonate-to-phosphate ratio, (c) crystallinity and (d) mineral maturity.

による骨質の可視化を行い、画像解析法とスペクトルによる各骨質因子の定量分析を行った。画像解析では ImageJ Fiji を用いて各骨質因子のヒストグラムを作製し、その平均値を算出した。[結果] 新規画像解析法と従来法のスペクトルにより算出したラット大腿骨皮質骨の骨質因子はどの部位においても強い正の相関を示した(Fig.2)。[結論] 画像解析法による骨質の定量分析は、迅速に行える骨質評価法として有用性が示された。また、画像解析から得られたヒストグラムによる新たな骨質評価法が見出された。

## 2. 画像解析法を用いた慢性腎臓病モデルラットの骨評価

慢性腎臓病(CKD)はミネラル代謝異常を伴い、病期の進行により骨密度低下や石灰化度、炭酸塩含有率の低下など骨質劣化を招くことから骨折リスクは上昇する<sup>3)</sup>。骨折予防を目的とした骨粗鬆症治療薬の使用において、投薬による骨密度や骨質の変化を調べることは極めて重要である。これまで我々は、様々なモデル動物の骨質評価を行う中でコラーゲン線維ならび低結晶性アパタイト配向性が骨強度に強く影響を及ぼすことを明らかにしてきた。そこで本研究では、骨代謝改善薬を投与した CKD の骨質に着目し、アレンドロネート(ALN)、副甲状腺ホルモン製剤テリパラチド(TPD)を投与した CKD モデルラット大腿骨のコラーゲン線維ならび低結晶性アパタイト配向性について検討した。[結果] CKD は Stage 4 相当、二次性副甲状腺機能亢進症、リン代謝異常、曲げ強度の低下、大腿骨石灰化度ならび炭酸塩含有率の低下から高回転型骨粗鬆症を認めた。皮質骨におけるコラーゲン線維配向性の評価では、骨内膜側において TPD は CKD および ALN に対して有意に高値を示した( $p < .05$ )。また、低結晶性アパタイト配向性も同様の傾向を示した。一方、同部位の石灰化度は、TPD、ALN とともに CKD に対してのみ有意に高値を示した。相関分析では、石灰化度と配向性については相関が認められなかったが、TPD のみでコラーゲン線維配向性と低結晶性アパタイト配向性の間に有意な正の相関が認められた。[考察] TPD、ALN とともに CKD に対して石灰化度の改善を認めるが、配向性の向上には骨形成が伴う必要があると考えられる。

### 参考文献

1. NIH Consensus Statement, **27-29;17(1)**, 1-45 (2000).
2. C. Marcott, R. C. Reeder, et al., Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand), **44(1)**, 109-115 (1998).
3. M. Ota, M. Takahata, et al., Osteoporosis. Int., **28(4)**, 1481-1490 (2017).