

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号： 13101
研究種目： 奨励研究
研究期間： 2021 ~ 2021
課題番号： 21H04287
研究課題名 EPMA、 μ CT、組織切片比較による硬組織石灰化度の定量精度の検討

研究代表者

五十嵐 文子 (Ikarashi, Ayako)

新潟大学・研究推進機構・技術職員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 470,000 円

研究成果の概要：本研究は、5週齢マウスの同じ標本の μ CT像、EPMA像、脱灰組織切片像を比較して、 μ CTを用いた石灰化評価の正確性と脱灰標本の染色性の原因をEPMAで検証し、 μ CT、EPMAを用いた硬組織解析の正確な利用法の提示を目的とした。

結果として、 μ CT石灰化密度解析とEPMA（カルシウム）解析結果が一致しており、両者が硬組織石灰化の評価に有用な方法であること、 μ CT石灰化密度解析は、EPMA解析より精密な石灰化の評価が可能なこと、EPMA（リン）解析は必ずしも石灰化度の評価と一致しないことがあること、硬組織脱灰標本のアザン染色性は石灰化とは異なる基質の状態を反映していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

μ CTは非破壊的に標本を評価でき、撮影後に研磨、脱灰標本作製が可能だが、骨塩量定量評価の正確性については十分に明らかになっていなかった。また、硬組織脱灰標本をアザン染色すると石灰化度の違いが染色性の違いとして現れるが、その染色性の違いの起因となる元素については不明であった。

本研究は、同じ標本の μ CT像、EPMA像、脱灰組織切片像を比較して、 μ CTを用いた石灰化評価の正確性と脱灰標本の染色性の原因をEPMAで検証し、 μ CT、EPMAを用いた硬組織解析の正確な利用法を提示したことに学術的意義がある。

研究分野： 生物科学

キーワード： 石灰化度 μ CT EPMA

1. 研究の目的

骨や歯を対象とした硬組織の形成メカニズムや病的状態を評価する客観的基準に石灰化度の評価がある。研磨標本の X 線顕微鏡写真（ラジオマイクログラム）や研磨または脱灰標本の染色性などから石灰化度を定性的に評価するのが一般的であったが、最近ではマイクロフォーカス X 線コンピュータ断層撮影（ μ CT）で骨梁の形態や骨塩量定量が可能になり、また、電子線マイクロアナライザ（EPMA）で硬組織の主体をなすヒドロキシアパタイトの構成要素 Ca や P の正確な定量が可能になり、硬組織石灰化度の客観的評価の精度が向上した。

μ CT は非破壊的に標本を評価でき、撮影後に研磨、脱灰標本作製が可能だが、骨塩量定量評価の正確性については十分に明らかになっていない。また、硬組織脱灰標本をアザン染色すると石灰化度の違いが染色性の違いとして現れるが、その染色性の違いの起因となる元素については不明である。

そこで、本研究は、同じ標本の μ CT 像、EPMA 像、脱灰組織切片像を比較して、 μ CT を用いた石灰化評価の正確性と脱灰標本の染色性の原因を EPMA で検証し、 μ CT、EPMA を用いた硬組織解析の正確な利用法の提示を目的とする。

2. 研究成果

5 週齢 ICR マウスを深麻酔下で灌流固定をし、切歯・臼歯を含む上下顎および脛骨のサンプルを切り出し、 μ CT（ScanXmate コムスキャンテクノ社製）で撮影、TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング社製）を用いて石灰化密度解析を行った。

μ CT 撮影後、右側は脱灰をして通法に従い脱水・パラフィン包埋を行い、5 μ m 厚組織切片を作製し、アザン染色を行った。左側はエポキシ樹脂に包埋し、面だし、研磨、導電処理を施して EPMA で Ca と P の元素マッピングを行った。

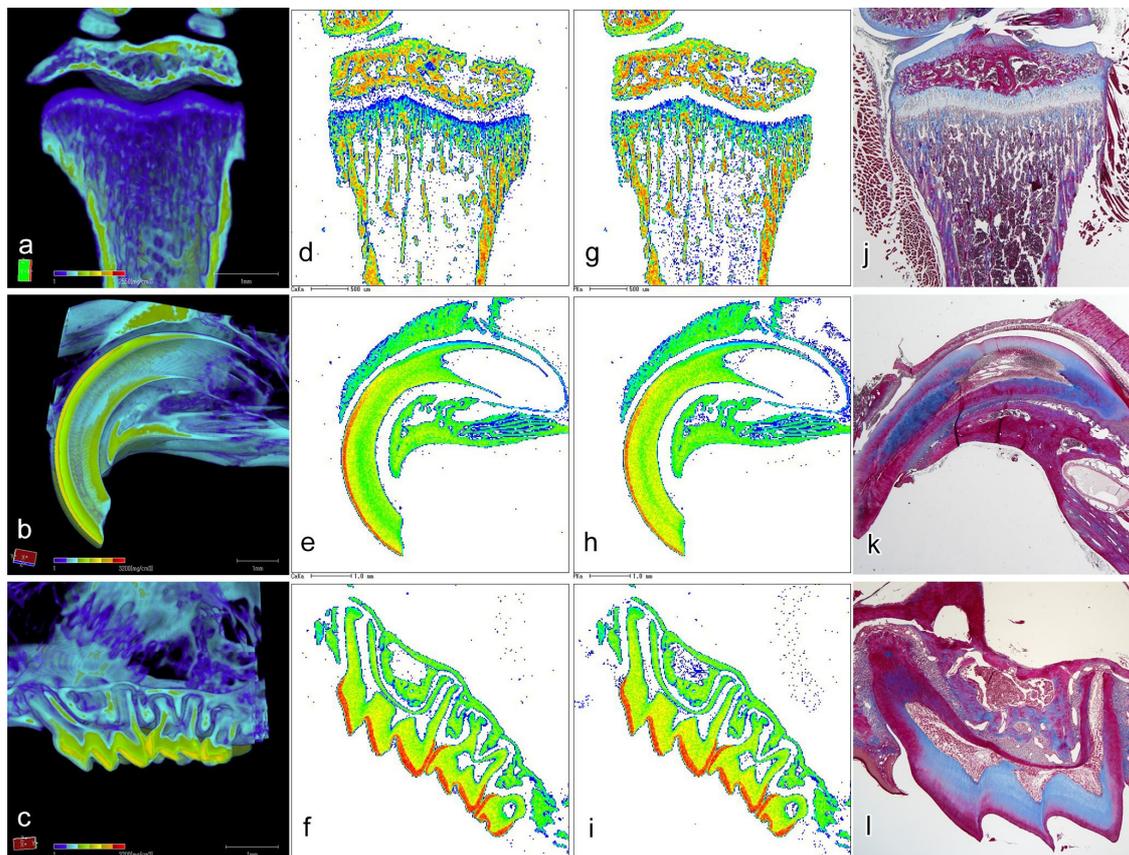


図 1. 脛骨 (a, d, g, j)、上顎切歯 (b, e, h, k)、上顎臼歯 (c, f, i, l) の μ CT 石灰化密度解析 (a-c)、EPMA (Ca) 解析 (d-f)、EPMA (P) 解析 (g-i)、アザン染色像 (j-l)。脛骨骨端部では、赤の染色性と高 Ca・P 領域とが一致しているが、歯では、染色性と高 Ca・P 領域との相関が認められない。尚、切片上では脱灰によりエナメル質は消失している。

アザン染色は膠原線維と筋線維を染め分ける手法で、脱灰標本では象牙質基質が部位により異なる染色性を示すことが知られている。EPMA の元素 (Ca、Mg、P) マッピング画像と比較すると、脛骨骨端部では、赤の染色性と高 Ca・P 領域とが一致していたが、歯では、染色性と高 Ca・P 領域との相関が認められなかった (図 1)。従って、硬組織脱灰標本の染色性は石灰化とは異なる基質の状態を反映していることが明らかになった。

また、 μ CT 石灰化密度解析では、EPMA 解析領域と同じ標本の脛骨皮質骨および海綿骨、上下顎切歯・臼歯のエナメル質および象牙質の定量解析を行った。

海綿骨 < 皮質骨 < 象牙質 < エナメル質の順番で有意に石灰化が亢進することが示され、EPMA の元素マッピングによる Ca 定量評価と一致していた (図 2)。

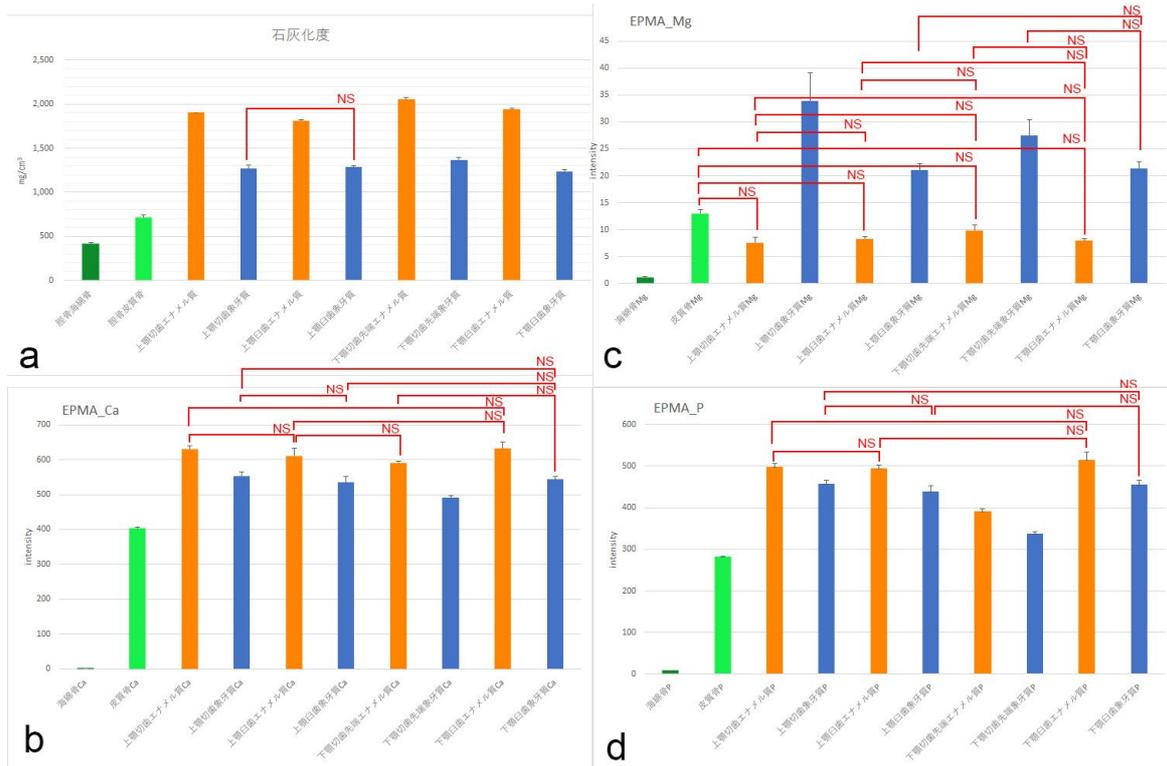


図 2 . 脛骨 (海綿骨・皮質骨) 上下顎切歯・臼歯 (エナメル質・象牙質) の μ CT 石灰化密度解析 (a) EPMA (Ca) 解析 (b) EPMA (Mg) 解析 (c) EPMA (P) 解析 (d). 一元配置分散分析後に多重比較 (Bonferroni 検定) を行った。NS: 有意差なし。その他はすべて有意差あり。

μ CT 石灰化密度解析において、海綿骨・皮質骨・象牙質・エナメル質間の違いに加え、上顎切歯象牙質と上顎臼歯象牙質間以外の各郡で各エナメル質・象牙質間の石灰化度の有意な違いを示すことができた。一方、EPMA 解析では、 μ CT 石灰化密度解析と同じ結果の出た Ca 解析において、一部を除いて、各エナメル質・象牙質間の有意な Ca 濃度の違いを示すことができなかった。従って、EPMA (Ca) 解析よりも、 μ CT 石灰化密度解析の方が、より精密な石灰化の評価が可能なる事が明らかとなった。

μ CT 石灰化密度解析と EPMA (P) の比較においては、概ね、海綿骨 < 皮質骨 < 象牙質 < エナメル質の順番で有意に P 濃度が亢進したが、一部、エナメル質と象牙質の濃度が逆転する現象が見られた。歯種によって、ヒドロキシアパタイトの組成が異なる事を示唆しているが、更なる解析が必要である。

EPMA (Mg) 解析においては、海綿骨 < エナメル質 < 皮質骨 < 象牙質の順番で有意に Mg 濃度が亢進した。石灰化度の高いエナメル質で Mg 濃度が有意に低い現象は、Mg が石灰化度にも影響を与える可能性を示唆するが、今後、更なる研究が必要である。

尚、海綿骨の EPMA 解析によるシグナル強度が低いのは、海綿骨が骨基質以外の軟組織を多く含むので、総体として低いシグナル検出になることが原因であるため、EPMA では海綿骨の定量評価は難しいと言える。

以上をまとめると、(1) μ CT 石灰化密度解析と EPMA (Ca) 解析結果が一致しており、両者が硬組織石灰化の評価に有用な方法であること、(2) μ CT 石灰化密度解析は、EPMA 解析より精密な石灰化の評価が可能なること、(3) EPMA (P) 解析は必ずしも石灰化度の評価と一致しないことがあること、(4) 硬組織脱灰標本のアザン染色性は石灰化とは異なる基質の状態を反映していることが明らかになった。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
田中 みか子	(Tanaka Mikako)
佐野 拓人	(Sano Hiroto)