

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760558

研究課題名 (和文) *In vivo* (生体内) 非破壊低侵襲型骨質解析法の確立研究課題名 (英文) Establishment of *In Vivo* Non-Destructive and Less-Invasive method for Analyzing Bone Quality

研究代表者

石本 卓也 (ISHIMOTO TAKUYA)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：50508835

研究成果の概要 (和文)：

透過型光学系を有する微小領域 X 線回折法を用い、摘出骨に対する骨質 (生体アパタイト配向性) 解析法を検討し、骨の線吸収係数解析と骨サイズ計測に基づく動物種・骨部位に依存した最適 X 線源の選択、最適 X 線を用いた正常・疾患・再生骨での配向性解析と本新規手法の妥当性の検証を達成した。さらに、本手法と試料での X 線吸収プロファイル解析との組合せにより、軟組織の外側からの骨部位の特定、骨部位からの X 線回折パターンの取得を可能とし、*in vivo* 非破壊低侵襲型骨質解析法が確立された。

研究成果の概要 (英文)：

For extracted bones (*ex vivo*), quantitative analysis of the preferred orientation of biological apatite was successfully achieved by using a microbeam X-ray diffraction technique with a transmission optical system. The analytical condition was optimized based on the X-ray absorption coefficient of bone tissue and bone morphology. To expand this technique for *in vivo* (non-extracted) bone, X-ray absorption profile was taken for the detection of bone totally inside of soft tissues. By combining these techniques, it was possible to detect bone and obtain X-ray diffraction information from bone *in vivo*. This means the *in vivo* non-destructive and less-invasive method for analyzing bone quality was established in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学／構造・機能材料

キーワード：骨質，生体アパタイト，配向性，微小領域 X 線回折法，透過型光学系，骨力学機能，低侵襲化

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会の到来による骨疾患の深刻化、患者の生活の質 (QOL) 向上の概念の

浸透によって、より精密かつ患者に対する負担の少ない骨診断技術の開発が要求されている。骨診断に要求される 2 大因子として、

(1) 骨強度を正確に反映する指標、(2) それを低侵襲で測定するための手法がある。従来、骨密度が絶対的な骨診断指標として用いられてきた。その背景には、軽微な骨疾患や骨再生は骨密度で充分評価可能であったこと、そして、骨密度が骨組織による軟 X 線の吸収量をベースとしたレントゲン法、CT 法等を用いて、簡便かつ低侵襲で計測可能である、といった、上記 2 要因を満足する条件が揃っていたためである。ところが、骨疾患の多様化や骨再生術の高度化にともない、「骨強度=骨密度」という従来の絶対的相関はもはや崩壊し、骨強度を強く説明し得る新規骨質指標の導入と、それを臨床で計測可能な手法の確立が急務課題となった。実際、NIH (米国国立衛生研究所) の 2000 年のコンセンサス会議にて、骨強度は骨密度と骨質の二つの要因からなるというステートメントが発表された。

それ以来、新規骨質指標の探索が盛んに行われ、種々の骨質指標が提案されている。とりわけ、申請者らのグループで注目している生体アパタイトの集合組織 (*c* 軸配向性) が、骨密度よりも強力に骨材質特性を制御する優れた骨質指標であることを、再生骨を用いた研究で明らかにした。

しかしながら、従来、アパタイト配向性の解析は、摘出骨の解析面を機械加工により露出後、反射型の X 線回折法を用いるといった、侵襲的な手法によって行われてきた。アパタイト配向性という極めて有力な新規骨質指標の臨床応用を目指すためには、可能な限り低侵襲な評価手法の導入・確立に向けた要素技術の開発を行う必要があった。

## 2. 研究の目的

骨力学機能を正確に反映し得る骨質指標である生体アパタイト配向性の、非破壊・低侵襲評価のため、図 1 のような、透過型光学系を有する微小領域 X 線回折法を用いた *in vivo* 解析法の確立を目的とした。目的の達成のため、(1) *ex vivo* (摘出骨) 透過法によ

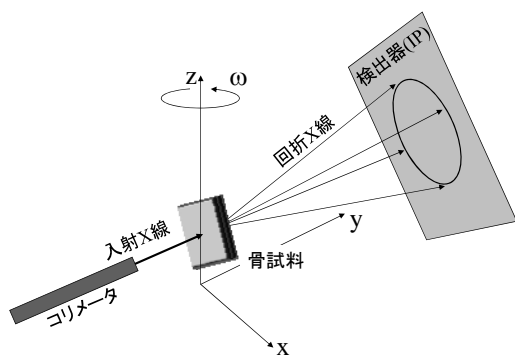


図 1 透過光学系を有する微小領域 X 線回折装置の模式図。

る解析法の確立、(2) *ex vivo* (摘出骨) 透過法から *in vivo* (生体内非摘出骨) 透過法への解析法の拡張といった 2 段階のアプローチにて研究を実施した。

## 3. 研究の方法

(1) *ex vivo* (摘出骨) 透過法による解析法の確立

摘出骨に対し、骨の線吸収係数計測に基づき、動物種・骨部位に最適な X 線源の最適化を行った。ラット頭蓋骨や長管骨にて微小領域 X 線回折測定を行い、X 線導入方向に垂直面内における生体アパタイト結晶からの二次元回折強度分布を取得し、配向性を定量化する手法について検討した。

(2) *ex vivo* (摘出骨) 透過法から *in vivo* (生体内非摘出骨) 透過法への解析法の拡張  
非摘出骨では、骨周囲に筋肉を主とする軟組織が存在することから、軟組織による X 線吸収の見積もりや軟組織外部からの骨部位への正確な X 線照射法について検討した。

## 4. 研究成果

X 線源として Mo-K $\alpha$  線を用い、骨の厚さ  $t$  を変化させつつ骨による X 線吸収量を計測し、 $I/I_0 = \exp(-\mu t)$  の式より骨の線吸収係数  $\mu$  を解析した。これに基づき Cu-K $\alpha$ 、Ag-K $\alpha$  に対する線吸収係数を算出し、厚さの異なる種々の骨に対して最適な X 線源を選択した。一例として、ラット頭蓋骨では Mo-K $\alpha$  線、ラビット頭蓋骨では Mo-K $\alpha$  もしくは Ag-K $\alpha$  線が回折情報を効率的に得るために最適であると判断された。

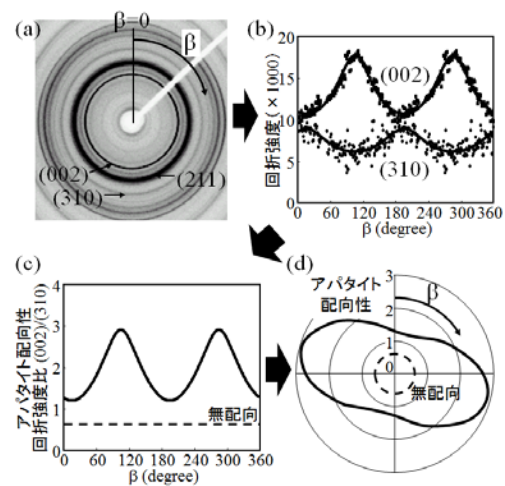


図 2 X 線回折パターンからの配向性の定量化法。(a) X 線回折パターン、(b) 回折強度積分と最小二乗法による関数近似、(c) 回折強度比による配向性定量化、(d) 二次元レーダー図化。

最適化された X 線を用い、正常ラット頭蓋骨にて X 線回折パターンを取得し、図 2 に示すように骨中生体アパタイトの *c* 軸配向性を二次元的に定量解析することに成功した。特に、アパタイト *c* 面を代表する (002) ピークと、それに垂直な (310) ピークの面内方向の強度分布は、180°の周期を有する関数にて有意に記述可能であった (図 2(b))。本手法は、その形態から従来非常に困難であった頭蓋骨での骨質解析を可能とするとともに、長管骨のような強い一軸配向性を有する骨にも適用可能であった。さらに、こうした配向性は、骨力学機能、特にナノインデンテーション法等によって計測されるヤング率といった材質特性に大きく寄与した。本解析法を適用することで、頭蓋骨を中心として、骨配向化・機能化機構や遺伝子組換え動物を含む疾患骨の病態解明を行うことが可能となった。

本手法を *in vivo* 解析に拡張するため、軟組織の X 線吸収係数を計測すると、軟組織の線吸収係数は骨の数値の 1/10 以下であり、軟組織による X 線の吸収率は骨に比べて非常に小さいことが示された。つまり、骨部位で発生した回折 X 線が周囲の軟組織で吸収される割合は、軟組織の厚さにも依存するものの比較的小さいといえる。そのため、X 線吸収解析により、軟組織の外側からの骨部位の特定が可能である。

図 3 に、*in vivo* にてマウス脛骨横断方向に取得した X 線吸収プロファイルを示す。線吸収係数の小さい軟組織からのブロードな吸収ピークの中に、線吸収係数の高い骨組織による吸収 (矢印) が認められる。さらには、管状の脛骨由来の特徴的な吸

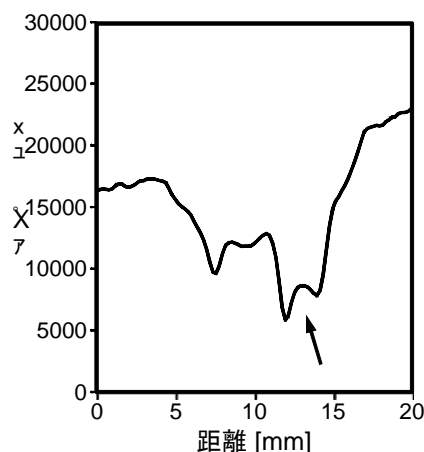


図 3 *in vivo* にてマウス脛骨横断方向に取得した X 線吸収プロファイル。

収プロファイル形状が検出可能であった。当該部位にて回折測定を行うことで、脛骨中アパタイトからの回折強度が抽出骨同様に検出されたことから、本研究の目的である「*in vivo* 非破壊低侵襲型骨質解析法の確立」が達成された。

なお、本研究は、動物実験委員会の承認を得て実施した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. T. Ishimoto, T. Nakano, M. Yamamoto and Y. Tabata: Biomechanical evaluation of regenerating long bone by nanoindentation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 22[4], pp. 969-976 (2011), 査読有.
2. T. Nakano, T. Ishimoto, J.-W. Lee, S. Miyabe, N. Ikeo and H. Fukuda: Evaluation and control of crystallographic alignment of biological apatite crystallites in bones *Materials Science Forum*, Vols. 654-656, pp. 2212-2215 (2010), 査読有.
3. T. Ishimoto and T. Nakano: Evaluation of mechanical properties of regenerated bone by nanoindentation technique, *Materials Science Forum*, Vols. 654-656, pp. 2220-2224 (2010), 査読有.
4. T. Ishimoto, T. Sakamoto and T. Nakano: Orientation of biological apatite in rat calvaria analyzed by microbeam X-ray diffractometer, *Materials Science Forum*, Vols. 638-642, pp. 576-581 (2010), 査読有.
5. T. Sakamoto, T. Ishimoto and T. Nakano: Analysis and formation mechanism of biological apatite (BAp) orientation in a growing rat skull model, *Proceedings of PFAM18* (Processing and Fabrication of Advanced Materials, Edited by M. Niinomi, M. Morinaga, M. Nakai, N. Bhatnagar, T.S. Srivatsan), pp. 1365-1372 (2009), 査読有.

[学会発表] (計 12 件)

1. 石本卓也, 阪本達志, 中野貴由: 頭蓋骨

- におけるアパタイト配向性の構築・再構築, 日本金属学会 2011 年春期(第 148 回)大会, 東京都市大学, 東京, 2011 年 3 月 25 日.
2. 安食拓哉, 石本卓也, 中野貴由: 骨成長および破骨細胞欠損にともなうマウス頭蓋骨の生体アパタイト配向性変化, 日本金属学会 2011 年春期(第 148 回)大会, 東京都市大学, 東京, 2011 年 3 月 25 日.
  3. 阪本達志, 石本卓也, 中野貴由: 頭蓋顔面インプラントの設計・開発のための頭蓋骨の骨微細構造解析, (社) 日本鉄鋼協会・(社) 日本金属学会関西支部 材料開発研究会, 大阪大学吹田キャンパス, 大阪, 2010 年 12 月 14 日.
  4. 安食拓哉, 阪本達志, 石本卓也, 李志旭, 中野貴由: マウス頭蓋骨の生体アパタイト配向性に及ぼす M-CSF の有無の影響, 日本金属学会 2010 年秋期(第 147 回)大会, 北海道大学, 北海道, 2010 年 9 月 26 日.
  5. 阪本達志, 石本卓也, 中野貴由: 頭蓋骨における生体アパタイト配向化の部位依存性, 日本金属学会 2010 年秋期(第 147 回)大会, 北海道大学, 北海道, 2010 年 9 月 26 日.
  6. T. Ishimoto and T. Nakano: Mechanical properties in regenerated bone evaluated by nanoindentation technique, The 7<sup>th</sup> Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM-7), Cairns Convention Centre, Cairns, Australia, August 5, 2010.
  7. 石本卓也, 阪本達志, 中野貴由: ラット頭蓋骨における骨成長にともなう生体アパタイト配向化, 第 30 回日本骨形態計測学会, 米子コンベンションセンター BIG SHIP, 鳥取, 2010 年 5 月 14 日.
  8. 阪本達志, 石本卓也, 中野貴由: ラット頭蓋骨における生体アパタイト配向性形成メカニズム, 日本金属学会 2010 年春期(第 146 回)大会, 筑波大学, 茨城, 2010 年 3 月 30 日.
  9. 石本卓也, 中野貴由: 生体アパタイト配向性による再生骨の評価と力学機能との
- 相関, 第 9 回 日本再生医療学会総会, 広島国際会議場, 広島, 2010 年 3 月 19 日.
10. T. Sakamoto, T. Ishimoto and T. Nakano: Analysis and formation mechanism of biological apatite (BAp) orientation in a growing rat skull model, 18th International Symposium on Processing and Fabrication of Advanced Materials (PFAM 18), Tohoku University, Sendai, December 13, 2009.
  11. 阪本達志, 石本卓也, 中野貴由: ラット頭蓋骨における生体アパタイト配向性形成過程の解析, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 京都, 2009 年 11 月 16 日.
  12. T. Ishimoto, T. Sakamoto and T. Nakano: Orientation of biological apatite in rat calvaria analyzed by microbeam X-ray diffractometer, International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials (THERMEC' 2009), Maritim Hotel Berlin, Berlin, August 28, 2009.
- [その他]
- 【受賞】**
1. 阪本達志, 石本卓也, 中野貴由: 平成 22 年度日本金属学会・鉄鋼協会関西支部材料開発研究会ポスターセッション 研究発表優秀賞「頭蓋顔面インプラントの設計・開発のための頭蓋骨の骨微細構造解析」に対して, 平成 22 年度日本金属学会・鉄鋼協会関西支部材料開発研究会, 大阪大学吹田キャンパス, 大阪, 2011 年 12 月 14 日.
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
石本 卓也 (ISHIMOTO TAKUYA)  
大阪大学・工学研究科・助教  
研究者番号: 50508835