

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670801

研究課題名(和文) T2緩和差を利用した31P-NMRによる骨塩量・新生骨量測定法

研究課題名(英文) Measurement method of new bone and bone mineral content by 31P NMR utilizing the T2 relaxation differential

研究代表者

篠原 淳 (Shinohara, Atsushi)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90196402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：目的：T2緩和差を利用した、31P NMRによる非侵襲的な新生骨信号量、骨塩量の測定法の確立を目指した。方法：11種類の合成リン酸カルシウムのT2緩和動態をCarr Purcell Meiboom Gill法を用いて測定し、新生骨量または骨塩量の描出測定条件の5候補を抽出後に2,4,6,9ヶ月齢のマウス脛骨近位部の信号を各6匹測定した。得られた信号量はT1緩和利用新生骨信号量測定法での信号量、DXAでの骨塩量との相関を解析した。結果：繰り返し時間30秒、積算20回とT1緩和利用新生骨信号量の相関が最も強く($r=0.740$)、新生骨信号量測定に適していた。一方、骨塩量の測定は困難であった。

研究成果の概要(英文)：Purpose: The aim of this study was to establish the non-invasive measurement method of new bone and bone mineral content by 31P NMR utilizing the T2 relaxation differential. Method: T2 relaxation dynamics of 11 types synthetic calcium phosphates were measure by CPMG method. After extracting 5 candidates which meet the measurement extraction criterions of new bone mass or bone mineral, the signals of the tibia of 2, 4, 6, 9 month old mice were measured. The correlation level of the obtained T2 signal intensity was investigated which was achieved by relating the bone mineral content by DXA and the new bone signal intensity of cancellous bone by 31P NMR measurement method using the T1 relaxation differential. Results: The T2 signal intensity at the condition of repetitive delay of 30 sec and 20 times accumulation exhibited the strongest correlation ($r=0.740$) with the new bone signal intensity of cancellous bone. On the other hand, the measurement of bone mineral content was not feasible.

研究分野：口腔外科

キーワード：T2緩和 骨組成 新生骨量 骨塩量 非破壊検査 核磁気共鳴

1. 研究開始当初の背景

骨評価は骨密度(あるいは骨塩量)と骨質の評価に分かれ、前者は二重エネルギー骨密度測定装置(DXA)等の測定機器によって測定されている。ところが、DXAを用いた骨塩量や骨密度の測定では骨組成別の骨量や密度を測定することは不可能である。より詳細な骨の診断や治療効果の判定にはこれらの測定法が必要であるが骨組成別の骨量や密度測定を非侵襲的かつ、短時間に行う方法の報告は国内外にない。骨の硬組織はリン酸カルシウムであることから、リンの核磁気共鳴を利用した³¹P-NMR(Nuclear Magnetic Resonance)法に着目し、各種リン酸カルシウムのT1磁気緩和動態を測定した。その結果、六方晶や非晶質の緩和時間の短い燐酸カルシウム信号量(短緩和型リン酸カルシウム)を5分で測定できる条件を発見した。次に、短緩和型リン酸カルシウム信号量と骨代謝マーカーの関係を検討したところ、この信号が新生骨由来であることが示唆された。そこで、骨形態計測法によりラットの骨端間骨部、海綿骨部、および皮質骨部の石灰化骨を新生骨と成熟骨に分類して新生骨量/全骨量を測定し、短緩和型骨リン酸カルシウム信号密度/骨密度(DXA法により測定)との関係を重回帰分析で解析した。その結果、短緩和型骨リン酸カルシウムが海綿骨部の新生骨であることが判明した。以上の結果から³¹P-NMRによって骨塩信号量(骨塩量)と新生骨量の測定が同時に行うことが可能であれば非侵襲的な³¹P-NMR二重測定法が確立できる。しかし、T1緩和利用法では骨塩量の測定時間は骨中のすべてのリン酸カルシウムの緩和が終了する必要があることから測定時間が長くなる可能性がある。そこでT1緩和が始まる前に緩和が完結するT2緩和を利用した短時間³¹P-NMR二重測定法を着想した。

2. 研究の目的

骨関連疾患や骨再生医療での評価法として非侵襲的な骨組成の定量が可能になれば、詳細な診断や治療効果の判定が可能になる。以前の研究では³¹P-NMRを用いて、骨リン酸カルシウムの縦(T1)緩和差を利用した海綿骨部の新生骨量測定法を新規に確立したが、成熟骨と新生骨の割合を得るには二重エネルギーX線吸収測定(DXA)法などの骨塩量測定法を併用する欠点があった。また、³¹P-NMRのみを用いてT1緩和を利用した骨塩量測定を考えると、測定時間が長くなる可能性がある。そこで本研究では横(T2)緩和がT1緩和よりも短いことに注目し、T2緩和差を利用した、³¹P-NMRのみでの新生骨信号量(新生骨量)、骨塩信号量(骨塩量)を測定する非侵襲的な短時間³¹P-NMR二重測定法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 基礎検討

11種類の合成リン酸カルシウム、すなわちトリカルシウムフォスフェート(TCP)非晶質、-TCP単斜晶、-TCP三方晶、ヒドロキシアパタイト(HAP)六方晶、HAP単斜晶、テトラカルシウムフォスフェート(TTCP)単斜晶、オクタカルシウムフォスフェート(OCF)三斜晶、アモルファスカルシウムフォスフェート(ACP)、フルオロアパタイト(FAP)六方晶、カーボネートアパタイト(CHAP)、カルシウム欠損HAPを用いた。これらの合成リン酸カルシウムのT2緩和動態の測定は核磁気共鳴(NMR)装置、JEOL; JNM-ECA600; 600MHzを用いて対象核は³¹Pに設定し、Carr Purcell Meiboom Gill法(step、Calculation delay(CD)、relaxation delay(RD)、積算回数を変数)により測定した(図1)。

(2) 新生骨、骨塩量の測定候補の抽出
様々な測定条件の中から、新生骨量または骨塩量の抽出測定条件の候補を抽出した。基礎検討からstepは182μ秒(図1)、CDは0.348m秒(図2)に固定する必要があった。そこで、RDと積算回数を可変項目として基礎検討を行った結果、RD=10秒、積算60回、測定時間10分、RD=30秒、積算20回、測定時間10分、RD=100秒、積算4回、測定時間6.7分、RD=200秒、積算3回、測定時間10分、RD=600秒、積算2回、測定時間20分を候補として抽出した(図3)。

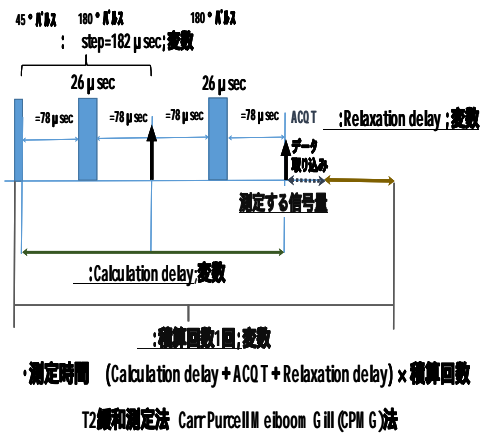


図1: stepは短くする必要があったが機器の性能上182μsecが最短であった。

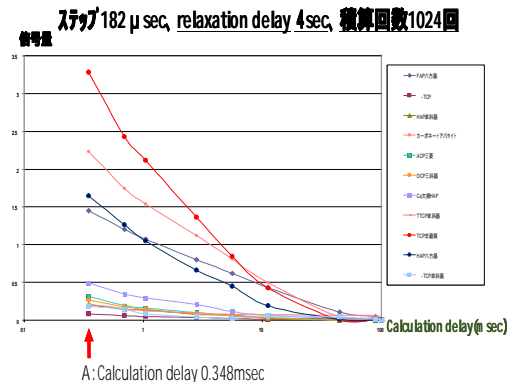


図2: 各合成リン酸カルシウムのT2緩和動態

CD=0.348m 秒、RD 4 秒、積算回数 1024 回時が最も高い信号量が得られた。これは他の RD と積算回数の条件でも確認できた。この条件では合成燐酸カルシウムは低信号群と高信号群に区分できる。

step 182 μsec, Calculation delay 0.348m sec, relaxation delay 100sec, 積算回数4回

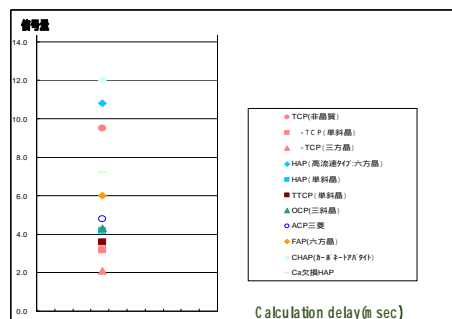


図 3: step は 182 μ 秒、CD は 0.348m 秒に固定し、測定候補の 1 つである RD 100 秒、積算回数 4 回時の結果を示す。合成燐酸カルシウムの信号量の差は図 2 の条件時よりも明確でなくなっている。

(3) マウス脛骨での ³¹P-NMR T2 信号の測定
次に 2, 4, 6, 9 ヶ月齢の雄 BALB/cAJcl マウスにテトラサイクリン(TC)、カルセイン(CL)による二重標識 (01TC: 0.02mg/g 皮下注射 -02-01CL: 0.01mg/g 皮下注射: -01) を行い、安楽死後に脛骨近位部を摘出して 70%エタノールに固定した。同部の ³¹P-NMR 信号を設定した 5 つの条件で各 6 匹ずつ測定した。

(4) マウス脛骨での ³¹P-NMR T1 緩和利用海綿骨部新生骨信号量の測定

T1 single pulse 法: RD=0.5 秒、積算 480 回、測定時間 4 分で脛骨近位部を測定した。

(5) マウス脛骨骨塩量の測定

DXA (Hologic Discovery: 小動物モード) を用いて脛骨近位部の骨塩量の測定を行った。

(6) 骨 ³¹P-NMR T2 信号と T1 緩和利用海綿骨部新生骨信号量測定法、および骨塩量との相関解析

得られたマウス脛骨での ³¹P-NMR T2 信号量とすでに確立されている T1 緩和利用海綿骨部新生骨信号量測定法で得られた信号量、及び DXA で得られた骨塩量との相関を Stat view5.0 日本語版を用いて解析した。

(7) 脛骨近位端の非脱灰研磨切片の作成

脛骨は Villanueva bone stain に 5 日間浸漬し、イタノールで脱水した後に未脱灰で methyl-methacrylate (Wako Chemicals, Kanagawa, Japan) に包埋し、マイクロトーム (LIECA, Germany) を用いて 5 μm 厚の前額断切片を作製した。

(8) 新生骨部の面積測定

T1 緩和利用海綿骨部新生骨信号量測定法との相関が得られる T2 緩和条件が確認出来た場合には、ラット脛骨近位端の非脱灰研磨切片を用いて海綿骨部における新生骨の面積を TC, CL 標識を利用した画像解析の手法で

測定した。方法は Image J を用いて皮質骨の領域を削除し、ソリソルト、二値化処理により蛍光標識部を抽出後に骨形態計測の手法を用いて新生骨領域を設定し、新生骨面積を測定した (図 4)。

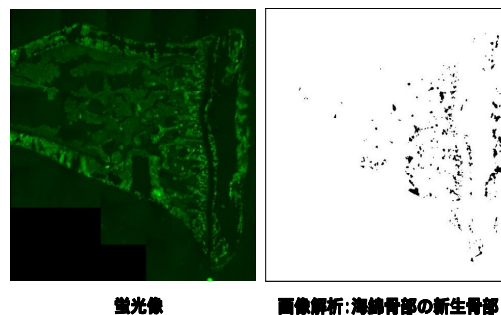


図 4

その後、得られた T2 緩和条件下での信号量と新生骨の面積の相関を解析した。

4. 研究成果

(1) 測定された T2 信号量と T1 緩和利用海綿骨部新生骨信号量との相関

Carr Purcell Meiboom Gill 法での測定条件である step=182 μ 秒、CD=0.348m 秒 RD=30 秒、積算 20 回、測定時間 10 分と T1 緩和利用新生骨信号量測定法である T1 single pulse 法の測定条件である RD=0.5 秒、積算 480 回、測定時間 4 分との相関が最も強く (r=0.740 P<0.0001) この条件が海綿骨新生骨信号量の測定に適していると考えられた (図 5)。

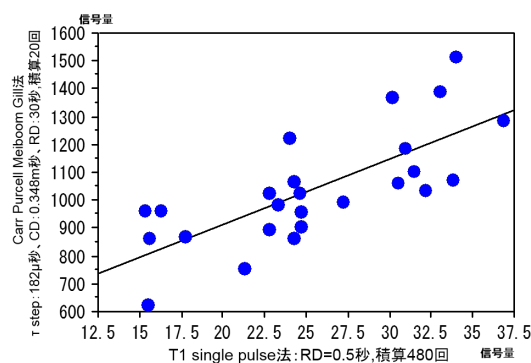


図 5

さらに画像解析で得られた海綿骨の新生骨の面積と Carr Purcell Meiboom Gill 法での測定条件である step=182 μ 秒、CD=0.348m 秒 RD=30 秒、積算 20 回との相関を解析したところ r=0.951 と強い相関が得られた。

(2) 測定された T2 信号量と DXA (Hologic Discovery) で得られた骨塩量との相関

抽出した測定条件で得られた T2 信号量は、いづれも骨塩量との相関は悪く ³¹P-NMR を用いた Carr Purcell Meiboom Gill 法での骨塩量測定は困難であった。

(3) 結論

Carr Purcell Meiboom Gill 法での測定条件のうち step=182 μ 秒、CD=0.348m 秒 RD=30 秒、積算 20 回では海綿骨の新生骨の信号量を抽出していることが明らかになった。

また、海綿骨の新生リン酸カルシウム組成は一定であると推察される。一方、骨塩量と正相関する条件は得られなかった。その理由としては ^{31}P -NMR では骨リン酸カルシウムのリンの信号を測定していることから、加齢によって骨リン酸カルシウムの組成の内、カルシウムなどの他のミネラル量の変化が原因ではと考えられた。すなわち ^{31}P -NMR による新生骨信号量(新生骨量)の測定は Carr Purcell Meiboom Gill 法でも可能であるが、 ^{31}P -NMR のみで新生骨信号量(新生骨量)と骨塩信号量(骨塩量)を測定する非侵襲的な短時間 ^{31}P -NMR 二重測定法は困難であると考えられる。

5. 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〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠原 淳 (SHINOHARA Atsushi)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90196402

(2)研究分担者

八上公利 (YAGAMI Kimitoshi)

松本歯科大学・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：00210211